

**Prävalenzen von Mutationen auf dem kodierenden Exon2  
des Connexin26 Genes in einem Patientenkollektiv einer  
mitteldeutschen Klinik**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Armin Hilmar Wolf**

**geboren am 02.09.1973 in München**

**Gutachter**

1. ....
2. ....
3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

## **Widmung**

Diese Dissertation ist meinen Eltern Frau Dr. med. Ilka Wolf und Herrn Dr. med. Wolfgang Wolf gewidmet.

Vielen Dank für die Unterstützung während meines Studiums.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1	Physiologie und Anatomie des Hörorgans	9
2.2	Hörstörungen	12
2.3	Nomenklatur und Systematik der Schwerhörigkeit	12
2.3.1	Klinische Beschreibung von Hörstörungen	13
2.3.1.1	Prinzip der Tonaudiometrie	13
2.3.1.2	Prinzip der BERA (Brainstem evoked response activity)	13
2.3.1.3	Beschreibung des Schweregrades von Hörstörungen	14
2.4	Erbliche Schwerhörigkeit	16
2.4.1	Einteilung der erblichen Schwerhörigkeit	16
2.4.1.1	Einteilung nach dem Vererbungsmodus	16
2.4.1.2	Syndromale und Nicht-syndromale Schwerhörigkeit	16
2.4.1.3	Familiäre und sporadische Schwerhörigkeit	18
2.4.2	Genetik der Schwerhörigkeit	18
2.5	Connexine	21
2.5.1	Aufbau und Struktur von Connexinen und Gap Junctions	22
2.5.2	Funktion der Connexine und Gap Junctions	24
2.5.3	Rolle von Connexinen in der Ätiologie von Erkrankungen	25
2.5.3.1	Connexine im Hörorgan	25
2.5.3.2	Connexin26 (GJB2)	27
2.5.3.3	Andere Connexine	30
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Patienten und Methoden</b>	<b>32</b>
4.1	Patienten	32
4.1.1	Einschlusskriterien	32
4.1.2	Schriftliche Einverständniserklärung	32
4.1.3	Anonymisierung der Daten	33
4.1.4	Standardisierter Fragebogen zur Datenerhebung	33

<b>4.1.5</b>	<b>Untersuchte Probandengruppen</b>	<b>33</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Charakterisierung der Patienten</b>	<b>34</b>
4.1.6.1	Geographische Herkunft	34
4.1.6.2	Ausmaß der Schwerhörigkeit	36
4.1.6.3	Betroffene Frequenzen	37
4.1.6.4	Assymetrie	38
4.1.6.5	Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung bzw. zum Zeitpunkt des erstmaligen Verdachts	39
<b>4.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Klinische Phänotypisierung</b>	<b>42</b>
4.2.1.1	Audiometrie	42
4.2.1.1.1	Reintonaudiometrie	42
4.2.1.1.2	Hirnstammaudiometrie	42
<b>4.2.2</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>43</b>
4.2.2.1	Verwendete Lösungen	43
4.2.2.2	Elektrophorese, Färbung, Darstellung im UV-Licht	45
4.2.2.3	DNA Extraktion	45
4.2.2.3.1	DNA Extraktion aus EDTA-Blut	45
4.2.2.3.2	Einstellung der DNA- Konzentration	46
4.2.2.4	PCR	46
4.2.2.4.1	Kontrolle der PCR	49
4.2.2.4.2	Aufreinigung der PCR Produkte	50
4.2.2.5	Sequenzierung	50
4.2.2.5.1	Auswertung der Sequenzen	51
4.2.2.6	Klonierung von unbekannten heterozygoten Mutationen	53
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Häufigkeit von Mutationen</b>	<b>55</b>
5.1.1	Kontrollen	55
5.1.2	Häufigkeit von Mutationen bei nicht miteinander verwandten Patienten	55
5.1.2.1	Allelverteilung	55
5.1.2.2	Häufigkeit von Genotypen	56
5.1.3	Patientenuntergruppen	57
5.1.3.1	Unterschiedliche geographische Herkunft	57
5.1.3.2	Ausmaß der Schwerhörigkeit	59
5.1.3.3	Familienanamnese (sporadische / familiäre Fälle)	62
<b>5.2</b>	<b>Betrachtung der einzelnen Mutationen</b>	<b>64</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Gdel35</b>	<b>64</b>
5.2.1.1	Prävalenz von Gdel35 in der gesamten Patientengruppe	64
5.2.1.2	Prävalenz der Gdel35 Mutation in Patientengruppen unterschiedlicher geographischer Herkunft	65

<b>5.2.2 Beschreibung des Phänotyps bei Vorliegen der Gdel35 Mutation</b>	<b>66</b>
5.2.2.1 Assymetrie	66
5.2.2.2 Schwerhörigkeitsgrad	66
5.2.2.3 Betroffene Frequenzen	68
<b>5.2.3 Korrelation Phänotyp / Genotyp anhand der Audiogramme</b>	<b>69</b>
5.2.3.1 komplett aufgeklärter Genotyp	69
5.2.3.1.1 Homozygotie Gdel35	69
5.2.3.1.2 Compound Heterozygotie	71
5.2.3.2 Mutationen nur auf einem Allel nachweisbar (monoallelisch)	72
5.2.3.2.1 Heterozygotie Gdel35	72
5.2.3.2.2 M34T	75
5.2.3.2.3 105, 314-327del(14)	76
 <b>6 Diskussion</b>	 <b>77</b>
<b>6.1 Genetisch - epidemiologische Aspekte</b>	<b>77</b>
<b>6.1.1 Zusammensetzung der Patientengruppe</b>	<b>77</b>
6.1.1.1 Erfassung ethnischer Unterschiede	77
6.1.1.2 Beschreibung des Erkrankungsalters	78
6.1.1.3 Vergleich der gefundenen Prävalenzen von DFNB1 und Gdel35-Mutationen mit anderen Studien	79
6.1.1.4 Rolle des Vererbungsmodus	81
<b>6.2 Klinische Aspekte</b>	<b>82</b>
<b>6.2.1 Schweregrad der Schwerhörigkeit in der Patientengruppe</b>	<b>82</b>
<b>6.2.2 Beschreibung der Cx26(GJB2)-assoziierten Schwerhörigkeit</b>	<b>82</b>
6.2.2.1 Schweregrad	82
6.2.2.2 Betroffene Frequenzen	83
6.2.2.3 Assymetrie der Hörstörung	85
6.2.2.4 Progression	85
<b>6.2.3 Diskussion der Audiogramme für die gefundenen Genotypen</b>	<b>86</b>
6.2.3.1 Gdel35	86
6.2.3.1.1 Betroffene Frequenzen und Schweregrad	87
6.2.3.2 M34T	88
6.2.3.3 Mutation 105	90
<b>6.3 Mögliche Anwendung der Mutationsdiagnostik im Connexin26 Gen zur Frühdiagnostik von Hörstörungen</b>	<b>90</b>
<b>6.3.1 Definitive Mutationsdiagnostik</b>	<b>92</b>
<b>6.3.2 Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen Untersuchungen</b>	<b>92</b>
<b>6.3.3 Zusammenfassende Bewertung der Mutationsdiagnostik</b>	<b>94</b>

<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>103</b>
9.1	Tabellen	103
9.2	Einverständniserklärung/Erhebungsbogen/Patienteninformation	107
9.3	Sequenzmuster	112
9.3.1	Primer	112
9.3.1.1	Sequenzmuster von Primer revold	112
9.3.1.2	Sequenzmuster von Primer revnew	113
9.3.1.3	Sequenzmuster von Primer fornew	114
9.3.2	Sequenzmuster von Mutationen	115
9.3.2.1	Homozygote Gdel35 Mutation	115
9.3.2.2	Sequenzmuster Mutation 105	116
9.3.2.3	Heterozygote Gdel35 Mutation	117
9.3.2.4	Heterozygote M34T (101T-C)	118
9.4	Danksagung	119
9.5	Lebenslauf	120
9.6	Ehrenwörtliche Erklärung	121

# 1 Zusammenfassung

**Einleitung:** In vorausgegangenen Arbeiten wurde von anderen Autoren gezeigt, dass Mutationen (sowohl rezessive als auch dominante) auf dem Connexin26-Gen bei einem erheblichen Teil schwerhöriger Patienten nachgewiesen werden können. Besonders in Fällen von sporadischer, frühkindlicher oder angeborener Schwerhörigkeit wurden hohe Prävalenzen von Mutationen auf dem Connexin26 Gen, Exon2 berichtet. Die Mutation Gdel35 macht dabei den Großteil (über 80%) der vorgefundenen Mutationen aus. In folgenden Studien wurde festgestellt, dass sowohl die Prävalenz als die Verteilung gefundener Mutationen im Connexin26-Gen in verschiedenen Bevölkerungen und Patientengruppen sehr unterschiedlich ist.

**Aufgabenstellung:** Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Prävalenz von Mutationen auf dem Connexin26-Gen im Patientengut einer deutschen Poliklinik für Pädaudiologie zu bestimmen. Analog zu den Voruntersuchungen wurde auch in dieser Studie das Exon2 des Connexin26-Genes untersucht. In die Studie einbezogen waren Patienten mit sporadischer oder familiärer frühkindlicher und kongenitaler non-syndromaler Schwerhörigkeit.

**Methoden:** 87 nicht verwandte Patienten der Klinik und Poliklinik für Pädaudiologie der Universität Münster wurden untersucht. In einer detaillierten Anamnese wurde eine traumatische oder toxische Anamnese ausgeschlossen, ein Audiogramm erstellt und die Hörstörung durch erfahrene Pädaudiologen charakterisiert. Aus EDTA-Blut wurde aus peripheren Lymphozyten DNA extrahiert und das kodierende Exon2 des Connexin26 Genes in seiner gesamten Länge mittels PCR amplifiziert und nachfolgend sequenziert. Alle Sequenzen wurden mit der Wildtypsequenz verglichen und so auftretende Mutationen auffindig gemacht. Heterozygote Mutationen, die noch nicht in der Literatur beschrieben worden waren, wurden kloniert und anschließend erneute sequenziert.

**Ergebnisse:** Insgesamt wurde bei 10,3% der sequenzierten Allele eine Mutation in Exon 2 des Connexin26-Gens nachgewiesen. In 83% handelte es sich hierbei um eine Gdel35 Mutation. Überträgt man diese Ergebnisse auf die einzelnen Patienten, so konnte in 13,5% der nicht verwandten Patienten mindestens eine Mutation auf dem Connexin26 Gen identifiziert werden. Einen autosomal rezessiven Erbgang vorausgesetzt, konnte der Genotyp in 6,9% der Patienten komplett – als homozygoter oder compound heterozygoter Genotyp - aufgeklärt werden.



Differenziert man die untersuchten Patienten weiter so lässt sich zeigen, dass bei Patienten südosteuropäischer Herkunft eine höhere Prävalenz von Mutationen vorlag (15 % mutierte Allele, 100 % davon Gdel35 Mutation). Die Gruppe der Patienten, die an einer mindestens hochgradigen Schwerhörigkeit litten, zeigte –verglichen mit Gruppen weniger stark ausgeprägter Schwerhörigkeit – eine deutlich höhere Prävalenz von Mutationen auf dem Connexin26 Gen (23% mutierte Allele ). Mit 22% der Patienten, die einen homozygoten oder compound heterozygoten Genotyp aufwiesen, waren in dieser Gruppe deutlich mehr Patienten, bei denen die Ursache der Schwerhörigkeit komplett aufgeklärt werden konnte als in allen anderen Gruppen. Die Schwerhörigkeit der Patienten, die mindestens eine Gdel35 Mutation aufwiesen, lässt sich bei offensichtlich heterozygoten (heterozygot mit unbekannter zweiter Mutation) Patienten tendenziell als hoch- bis mittelgradige Schwerhörigkeit beschreiben, die eine besonders starken Defekt im Hochtonbereich zeigte. Patienten die einen Gdel35-homozygoten Genotyp aufwiesen, zeigten eine stärker ausgeprägte Schwerhörigkeit, die - ebenfalls wie in der Gruppe der offensichtlich heterozygoten Patienten - im Hochtonbereich zusätzlich verstärkte Defekte aufwies.

**Diskussion:** In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von Mutationen auf dem Connexin26-Gen bei Patienten einer deutschen Klinik deutlich niedriger liegt als vorher beschriebene, hohe Prävalenzen bei Patienten im Mittelmeerraum. Niedrigere Prävalenzen, wie sie ähnlich bereits für Nordeuropa (Belgien/England) beschrieben wurden, konnten bestätigt werden. Der Vergleich mit anderen Studien zu Prävalenzen im mitteleuropäischen Raum zeigte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Patientengruppen ähnliche Ergebnisse. In der Gruppe der Patienten mit mindestens hochgradiger Schwerhörigkeit wurden die höchsten Prävalenzen von Mutationen auf dem Connexin26 Gen, Exon2 gefunden. Daher wäre für diese Gruppe eine genetische Diagnostik mit Nachweis von Mutationen im Connexin26-Gen möglicherweise sinnvoll.

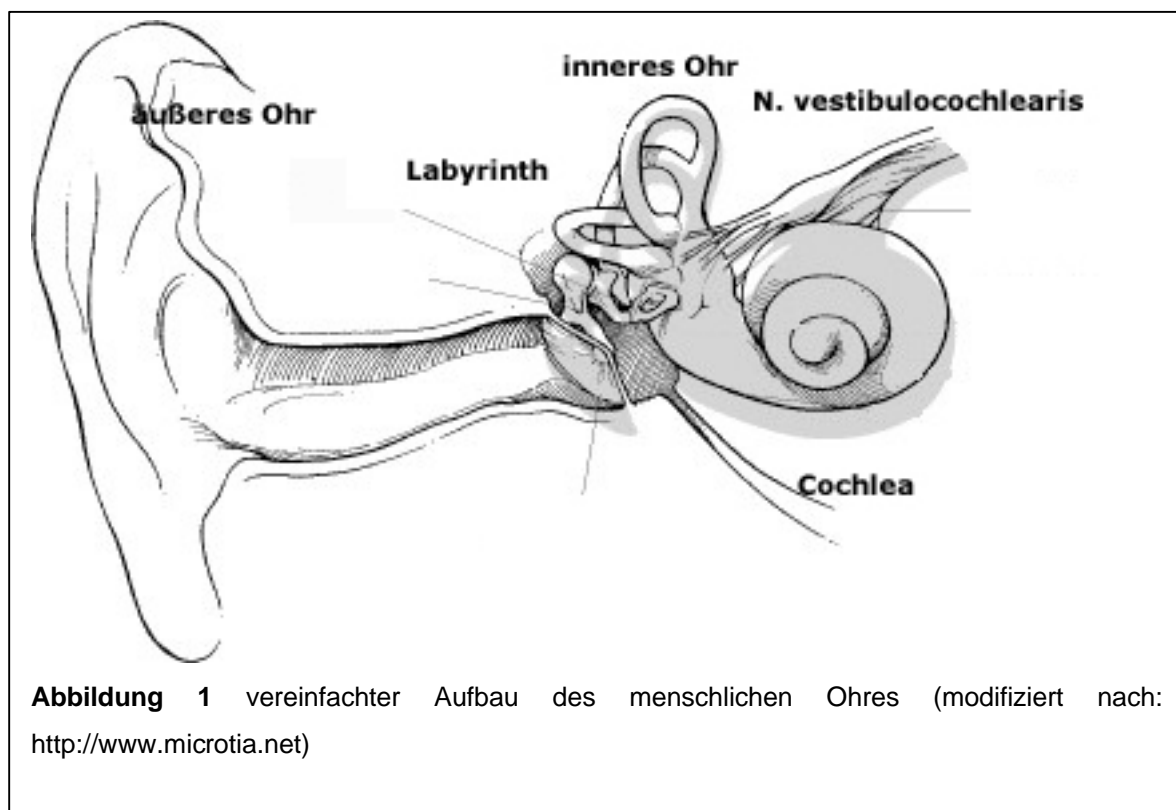
**Schlussfolgerung:** Häufigkeiten von Mutationen auf dem Connexin26 Gen sind in Deutschland niedriger anzusetzen als in Südeuropa. Genaue demographische Zahlen verlangen die Untersuchung größerer Patientengruppen. Die Schwerhörigkeit von Patienten, deren Genotyp komplett aufgeklärt werden konnte, sollte klinisch genau beschrieben werden, mit dem Ziel, einzelne Attribute einer Connexin26-korrelierten Schwerhörigkeit nachzuweisen. Patienten oder Familien, die an dieser genau definierten Schwerhörigkeit leiden, könnten im Rahmen einer genetischen Beratung Hilfe bei der Vorhersage des Erkrankungsrisikos angeboten werden.

## 2 Einleitung

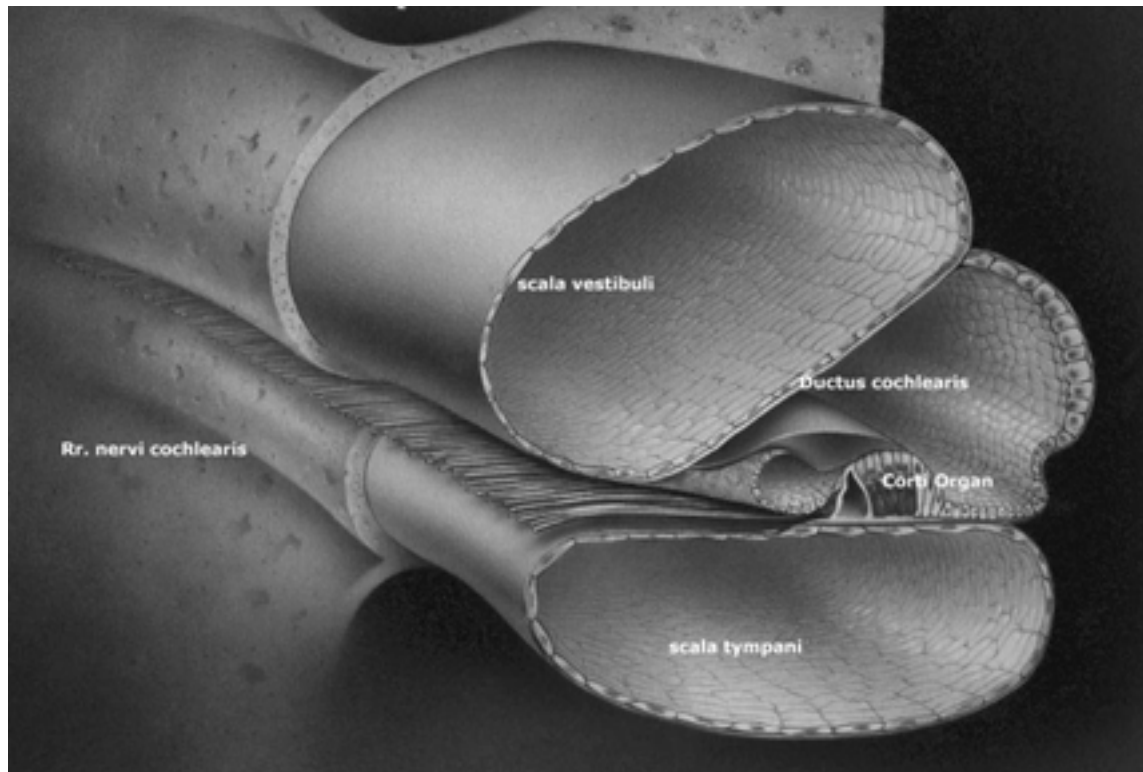
### 2.1 Physiologie und Anatomie des Hörorgans

Das Ohr als Sinnesorgan ist eines der wichtigsten Organe des Menschen. Es dient der Sinneswahrnehmung des Schalls und ist somit Grundlage der sprachlichen Kommunikation ohne die ein Individuum aus der Gesellschaft ausgeschlossen sein kann (Deetjen und Speckmann, 1999).

Schall wird als Druckwelle durch das äußere Ohr aufgenommen. Dabei passiert dieser zunächst als physikalische Form einer Schwingung das äußere Ohr, bestehend aus Ohrmuschel und äußerem Gehörgang (Berghaus, 1996)(siehe Abb.1). Über das Mittelohr, insbesondere durch das Trommelfell und die in der Paukenhöhle befindlichen Knochenkette aus Malleus, Incus und Stapes wird der Schall an das ovale Fenster - und somit an das Innenohr- weitergeleitet (Klinke, 1995). Die Funktion des Mittelohres liegt in der Impedanzanpassung, dabei wird die Hörleistung, je nach Frequenz um 10-20 dB verbessert (Klinke, 1995).



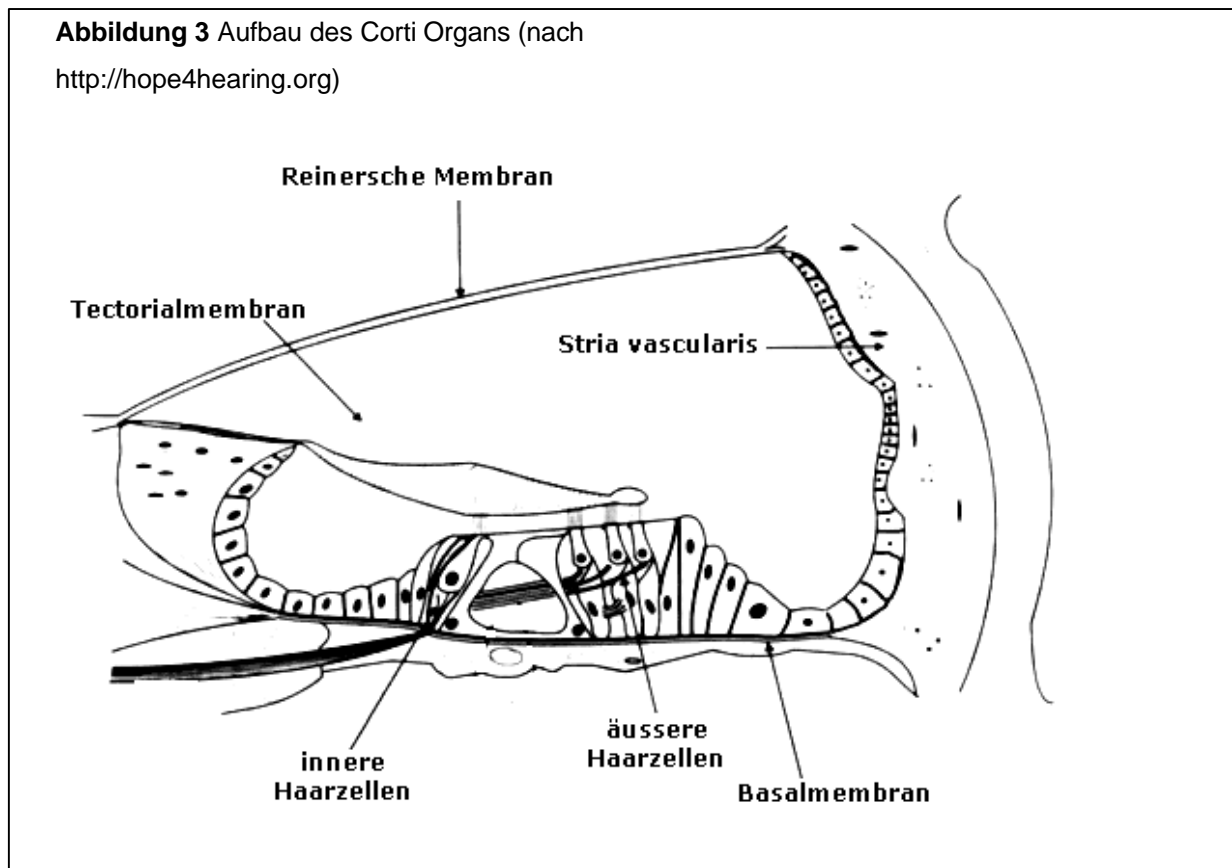
Schallwahrnehmungsorgan ist das Innenohr. Das Hörorgan des Innenohres ist die Schnecke (Cochlea) mit ihren 2,5 Windungen. Sie steht in enger funktioneller wie anatomischer Beziehung zum Gleichgewichtsorgan. Die Cochlea unterteilt sich in Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani (siehe Abbildung 2) und besteht aus einem knöchernem und einem häutigen Labyrinth. Das knöcherne Labyrinth ist gefüllt mit Perilymphe. In ihr „schwimmt“ das häutige Labyrinth (Schiebler und Schmidt, 1977).



**Abbildung 2** Übersicht Querschnitt durch die Cochlea (aus <http://www.pacifier.com>, modifiziert)

Die Scala media wird von der Scala vestibuli durch die sogenannte Reissner Membran, von der Scala tympani durch die Basilar membran getrennt. Scala tympani und Scala vestibuli stehen am Helicotrema miteinander in Verbindung. In ihnen (Scala tympani und Scala vestibuli) befindet sich, wie im gesamten knöchernen Labyrinth, perilymphatische Flüssigkeit. Sie ist ähnlich einer extrazellulären Flüssigkeit zusammengesetzt und enthält entsprechend viel Natrium (ca. 140 mmol/l). Im Gegensatz dazu enthält die Scala media Endolymphe, welche von der Stria vascularis produziert wird. Endolymphe ist reich an Kalium (ca. 145 mmol/l) und ähnelt somit der Zusammensetzung einer intrazellulären Flüssigkeit. Der endo- bzw. perilymphatischen Raum der Cochlea steht jeweils mit dem endo- bzw. perilymphatischen des Gleichgewichtsorgan in Verbindung (Klinke, 1995).

**Abbildung 3** Aufbau des Corti Organs (nach <http://hope4hearing.org>)



Umsetzungsorgan von Schallwellen zu neuronalen Impulsen ist das Corti-Organ. Es befindet sich in der Scala media und sitzt auf der Basilarmembran (Siehe Abb. 2 und 3). Diese wird gemäss dem Prinzip der Tonotopie nur an der Stelle erregt, an der sie für die jeweilige Frequenz das Rigiditätsoptimum besitzt. Das Corti-Organ wird von der Lamina tectoria bedeckt. Die für diese Darstellung wichtigsten Elemente sind die mit den efferenten und afferenten Fasern des N. cochlearis in Verbindung stehenden inneren und äusseren Haarzellen. An ihrer lumenseitigen Spitze besitzen diese Zellen Villi. Diese stehen mit der Tectorialmembran in Verbindung. Untereinander verbunden sind diese Villi einer Haarzelle durch Tiplinks, die als dünne Proteinfäden von einem Villi zur Spitze des nächst größeren Villis ziehen. Beim Transduktionsprozess kommt es durch die Relativbewegung der Basilarmembran zur Tectorialmembran über den direkten Kontakt der Villi zur Tectorialmembran, bzw. durch die Flüssigkeitsbewegung der subtektorialen Endolymphe zu einer Abbiegung der Villi. Dadurch werden Ionenkanäle an der Spitze der Haarzellen geöffnet. Durch den bis zu 150 mV betragenden Potentialunterschied zwischen Endolymphe und inneren Haarzellen kommt es nun zum Kaliumionen-Einstrom in die Haarzelle. Dies hat eine Depolarisation der Haarzelle zur Folge. Immunohistochemische und ultrasrukturelle

Analysen (Kikuchi et al., 1995) zeigten bei der Ratte ein verstärktes Vorkommen von Connexin26 Proteinen im Bereich des Corti Organes (Kikuchi et al., 1995). Connexin26 (Cx26) positiven Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Gruppe 1 nonsensory cells, Gruppe 2 connective tissue cells. In Weiterführung von zahlreichen älteren Forschungsarbeiten liegt der Schluss nahe, dass es seriell angelegte Gap Junctions (aus Connexinen gebildete Einheit, Erläuterung siehe unter 2.5 Connexine) gibt, die als eine Struktur für einen Kalium-Ionen-Recyclingweg dienen (Somjen GG, 1979, Santos-Sacchi, 1991, Jahnke K, 1975, Forge 1984).

## **2.2 Hörstörungen**

Schwerhörigkeit ist eine Erkrankung, die das soziale Erleben des Betroffenen stark einschränkt. Besonders schwerwiegend ist dabei das Auftreten von Hörstörungen vor Beginn des Spracherwerbs (prälinguale Schwerhörigkeit). Da Schwerhörigkeit sich auf die Spracherwerbung auswirkt in dem Sinne, dass sie zu einer verspäteten oder behinderten Sprechfähigkeit führt, ist die sprachliche Kommunikation gestört. Voraussetzung für eine optimierte sprachliche Entwicklung sind einerseits das frühzeitige Erkennen der Schwerhörigkeit sowie eine adäquate Versorgung mit schallverstärkenden Geräten während der sensitiven Periode für Sprachentwicklung. Verbesserte Hörgeräte sowie die Entwicklung von Cochlea-Implantaten ermöglichen heute eine optimierte Versorgung. Schwerhörige Kinder, die mit einem verstärkendem Gerät (z.B. Hörgerät) so früh wie möglich postnatal versorgt werden, haben eine wesentlich größere Chance normale Sprache und Kommunikationsfähigkeit zu erlangen (Loizou, 1999, Yoshinaga-Itano et al., 1998).

## **2.3 Nomenklatur und Systematik der Schwerhörigkeit**

In der gängigen Nomenklatur von Hörstörungen stehen mehrere unterschiedliche Systeme nebeneinander. Für eine anatomische Einteilung wird Schwerhörigkeit in konduktive Hörstörungen (schallleitungsbedingt), sensorineurale (schallempfindungsbedingt) und kortikale sowie zahlreiche Mischformen eingeteilt (Kalatzis und Petit, 1998, Böhme, 1984).

Ferner wird prälinguale von postlingualer Schwerhörigkeit unterschieden: Prälinguale Schwerhörigkeit manifestiert sich vor dem Spracherwerb des Individuums, postlinguale Schwerhörigkeit tritt definitionsgemäß nach dem Spracherwerb auf.

Postlingualen Hörstörungen werden meist durch altersbedingte Veränderungen (Presbyakusis), Traumata und nur in seltenen Fällen durch Gendefekte verursacht. Bei prälingualen Formen spielen diese eine wesentlich größere Rolle (Petit 1996, Wendler,

1987). Neben hereditären Ursachen liegen häufig frühkindliche oder intrauterine Infektionen (z.B. Rubeola, CNV oder fortgeleitete Meningitiden) diesen Schwerhörigkeiten zugrunde. Anhand der erhobenen audiologischen Befunden kann man Schwerhörigkeit nach betroffenen Frequenzen und Schweregrad der Schwerhörigkeit klassifizieren.

### **2.3.1 Klinische Beschreibung von Hörstörungen**

Je nach Lokalisation der Störung in der Cochlea wird die basocochleäre, also nahe des ovalen Fensters lokalisierte von einer mediocochleären oder apikocochleären, also nahe des Helikotremas gelegene Störung, unterschieden. Mischformen sind möglich. Die Bezeichnung pancochleär beschreibt eine Schädigung entlang der gesamten Cochlea und betrifft somit alle Frequenzen. Alternativ findet sich eine Einteilung nach betroffenen Frequenzen in Hochton- und Tiefton-Schwerhörigkeit.

#### **2.3.1.1 Prinzip der Tonaudiometrie**

Eine orientierende Prüfung des Hörvermögens erfolgt zunächst mit der subjektiven Methode der Tonaudiometrie. Diese prüft einzelne, definierte Frequenzen im Hauptsprachbereich (Standard: 125 Hz – 8 kHz) (Wolf, 2001) (Böhme, 1996). Töne werden dem Patienten über Kopfhörer, Knochenleitungshörer oder Lautsprecher mit steigender Lautstärke dargeboten. Der Patient gibt an ab welcher Lautstärke er den Ton hört. Es ist die Luftleitung von der Knochenleitung zu unterscheiden.

#### **2.3.1.2 Prinzip der BERA (Brainstem evoked response activity)**

Die Untersuchungsmethode der Brainstem evoked response activity (BERA) gehört zu den elektrophysiologischen, objektiven Methoden der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Sie ist eine Untergruppe der Electric Response Audiometry (ERA). Hier werden – ähnlich der Elektro Enzephalo Graphie (EEG), aus der sich die ERA entwickelte (Dawson, 1954) - elektrische Potentiale der einzelnen anatomischen Strukturen auf unterschiedliche Reize aufgezeichnet.

Die heutigen Messtechniken können die Reizantworten einzelnen Stationen des Hörsystems weitgehend zuordnen (Lehnhardt, 2000). Innerhalb der BERA, also der Untersuchung der audiologischen Funktion des Hirnstammes, ist die Erfassung der frühen auditorisch evozierten Potentiale (FAEP) die vorherrschende Methode.

Bei der Beschreibung der Antwortmuster werden die verschiedenen Wellen (Peaks oder Jewett) mit römischen Zahlen (I-V) bezeichnet. Die einzelnen Peaks werden anatomisch unterschiedlichen Generatoren zugeordnet. Durch Auswertung der unterschiedlichen

Latenzen und Amplituden (Pegel-Latenzfunktion) kann eine Schädigung einzelnen Strukturen zugeordnet werden (Click-BERA) (Lehnhardt, 2000).

Wegen der unspezifischen Reizantwort ist eine Unterscheidung in Tiefton- und Mitteltonschwerhörigkeit nur anhand der FAEP-Befunde nicht möglich. Durch Reizmaskierung und Phasendifferenz der Tonbursts (Reize) können aber auch hier mit erhöhtem Aufwand differenzierte Antworten erhalten werden. Die Notched-Noise-Technik erlaubt eine frequenzspezifische Ableitung akustisch evozierter Potentiale für alle Frequenzen. Hier werden bei gleichzeitiger Maskierung durch Rauschen FEAP mit einem Tonburst (Trapezreiz) provoziert und abgeleitet.

### 2.3.1.3 Beschreibung des Schweregrades von Hörstörungen

Die grobe Einteilung der Schwerhörigkeit in vier Stufen (geringgradig, mittelgradig, hochgradig, an Gehörlosigkeit grenzende Schwerhörigkeit) orientiert sich an der Hörweite für Umgangssprache des Hörgesunden. In der Praxis wird der Schweregrad anhand der audiometrischen Befunde erhoben und nach Tabelle 1 eingeteilt.

Hörverlust	Grad der Schwerhörigkeit
</= 20 dB	Normales Hörvermögen
20-40 dB	Geringgradige Schwerhörigkeit
40-50 dB	Mittelgradige Schwerhörigkeit
50-60 dB	Mittel-hochgradige Schwerhörigkeit
60-80 dB	Hochgradige Schwerhörigkeit
80-90 dB	An Taubheit grenzende Schwerhörigkeit
>90 dB	Hörrestigkeit

**Tabelle 1:**  
Klinische Einteilung der Schwerhörigkeit, Einteilung nach Ptok (Ptok, 1997)

Eine differenzierte Einteilung der Schwerhörigkeit anhand der Audiogramme wird von Liu aufgeführt (Liu, 1994). Hierbei werden neben dem Grad der Schwerhörigkeit auch die betroffenen Frequenzen berücksichtigt und die Audiogramme nach ihrem Verlauf unterschieden. Tabelle 2 gibt die Einteilung der Audiogramme wieder.

Verlauf	Definition
Flach (Flat)	Hörschwelle der hohen, mittleren und tiefen Frequenzen unterscheidet sich um weniger als 10 dB HL (dB Hearing level)
Hochfrequenzbereich	
Steil abfallend (Sharply sloping)	Entweder Unterschied von mehr als 25 dB HL der Summe des Hörverlustes bei 4 kHz, 6 kHz und 8 kHz und der Summe der Hörverlustes bei 500 Hz, 1 kHz und 2 kHz, oder der Unterschied zwischen zwei beliebigen Frequenzen mit einem Unterschied einer Oktave (i.e. Verdopplung der Frequenz) ist mehr als 25dB
Flach abfallen (gently sloping)	Unterschied der Summen des Hörverlustes bei den Frequenzen 4 kHz, 6 kHz und 8 kHz und des Hörverlustes bei 500 Hz, 1 kHz und 2 kHz liegt zwischen 10 und 24 dB HL (dB Hearing level)
Resthörvermögen (residual)	Nur Resthörvermögen im unteren Frequenzbereich
Spezifische Formen (specific)	
U-Form-Verlauf (U-shaped)	Mittlere Frequenzen sind um mehr als 15 dB stärker als niedrige oder hohe Frequenzen betroffen
Ansteigend (ascending)	Niedrige Frequenzen sind um mehr als 10 dB stärker betroffen als hohe Frequenzen

**Tabelle 2:** Übersicht über Einteilung der Audiogramme nach Liu (Liu, 1994).



## **2.4 Erbliche Schwerhörigkeit**

### **2.4.1 Einteilung der erblichen Schwerhörigkeit**

Genetische Schwerhörigkeit kann je nach Familienanamnese sporadisch und familiär auftreten. Erbliche Schwerhörigkeit wird zum einen nach deren Vererbungsmodus (rezessiv, dominant, x-chromosomal, mitochondrial), zum anderen nach der Vergesellschaftung mit anderen Auffälligkeiten (syndromal, nicht-syndromal) eingeteilt.

#### **2.4.1.1 Einteilung nach dem Vererbungsmodus**

In vielen Fällen von familiärer Schwerhörigkeit liegt ein eindeutiger Vererbungsmodus vor, es handelt sich um eine erbliche Schwerhörigkeit. Königsmark teilte die erblichen Fälle von Schwerhörigkeit in rezessive, dominante und x-chromosomale Fälle ein und versuchte diese gemäß ihrem Vererbungsmodus klinisch zu beschreiben und in weitere Untergruppen einzuteilen (Königsmark und Gorlin, 1976). Die Einteilung in (autosomal) rezessive, dominante, x-chromosomale und mitochondriale Schwerhörigkeit wird in der Literatur beibehalten.

#### **2.4.1.2 Syndromale und Nicht-syndromale Schwerhörigkeit**

Die Einteilung in syndromale und nicht-syndromale Formen der genetischen Schwerhörigkeit orientiert sich an der möglichen Vergesellschaftung der Hörstörung mit weiteren klinischen Auffälligkeiten. Grundlage dieser Einteilung bildet die Tatsache, dass Schwerhörigkeit sowohl isoliert als auch in Verbindung mit unterschiedlich auffälligen Nebenerkrankungen in Erscheinung tritt.

Diese Einteilung erfährt ihre Berechtigung durch die Annahme unterschiedlicher genetischer pathologischer Hintergründe. Tabelle 3 gibt einen Überblick über Fehlbildungen, die mit Schwerhörigkeit vergesellschaftet sein können und bei denen genetische Hintergründe zu diesem Zeitpunkt (07/2001) bekannt sind (syndromale Formen der Schwerhörigkeit).

Name	Schwerhörigkeit verbunden mit:
Alport Syndrom	Chron. Nephritis, Augenveränderungen
Jervell und Lange-Nielsen Syndrom	Kardialer Reizleitungsstörung
Norrie Krankheit	Pseudoglioma Retinae, Oligophrenie
Stickler Syndrom	Arthropathie, Ophthalmopathie
Usher Syndrom	Retinitis pigmentosa, Nystagmus, Epilesie
Pendred Syndrom	Jodstoffwechselstörung
Treacher Collins Syndrom	Dysostosis mandibulofacialis
Waardenburg Syndrom	Partieller Albinismus, Augenfehlbildungen, weitere Dysplasien

**Tabelle 3** modifiziert nach van Camp (<http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>) und Koletzko und von Harnack [Harnack, 1997] und Pschyrembel [Pschyrembel, 1990]

Dem gegenüber handelt es sich bei der nicht-syndromalen Form der Schwerhörigkeit um eine Manifestation der Schwerhörigkeit ohne weitere Fehlbildungen. Die Diagnose einer nicht-syndromalen Schwerhörigkeit ist eine Ausschlussdiagnose.

Sowohl syndromale als auch nicht-syndromale Schwerhörigkeit werden in rezessive, dominante, X-chromosomale und mitochondriale Formen unterschieden (Camp, 2000 #20). Für jede dieser Formen und Erbgänge sind jeweils zahlreiche genetische Loci beschrieben. Syndromale Formen der Schwerhörigkeit werden nach den jeweiligen Syndromen bezeichnet (z.B. USH3A für Usher-Syndrom Typ 3A).

Die Loci für nicht-syndromale Hörstörungen werden mit den Kürzeln DFNA und DFNB benannt (siehe Tabelle 4). Dabei steht DFN für „Deafness, nonsyndromic“. Der darauffolgende Buchstabe „A“ oder „B“ bezeichnet den Vererbungsmodus für den Locus. Der Buchstabe „A“ wurde per definitionem für den dominanten Erbgang festgelegt, der Buchstabe „B“ wird für den rezessiven verwendet. Eine darauffolgende Zahl dient zur Identifizierung des Loci (Kalatzis und Petite, 1998) (Antonarakis, 1998).

In Arbeiten vor 1997 wird auch der Ausdruck NSRD für non-syndromic recessive deafness verwendet. Er entspricht dem Ausdruck DFNB (Carrasquillo et al., 1997).

Der x-chromosomale Erbgang erhält keine weitere Bezeichnung, er besteht nur aus DFN und einer darauffolgenden Zahl zur Identifizierung (Kalatzis und Petit, 1998).

Mitochondriale Erbgänge werden- unabhängig ob syndromaler oder nicht-syndromaler- einer anderen Nomenklatur gemäss benannt (Camp, 2000)(Kalatzis und Petite, 1998).

Gemäß dieser Nomenklatur sind derzeit (Stand Juli 2001) über 20 rezessive Loki. Ein Überblick über Loki mit bekannten Genen stellt Tabelle 4 dar.

#### **2.4.1.3 Familiäre und sporadische Schwerhörigkeit**

Eine weitere Einteilung unterscheidet die familiäre von der sporadischen Schwerhörigkeit.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Definitionen verwendet:

Sporadisch	In der Familienanamnese ist in den vorhergehenden zwei Generationen kein Fall von idiopathischer Schwerhörigkeit bekannt. Ausgenommen wurde Presbyakusis.
Familiär	Vorliegen eines Falles von idiopathischer Schwerhörigkeit innerhalb der letzten zwei Generationen.

#### **2.4.2 Genetik der Schwerhörigkeit**

Neben seltenen erblichen Schallleitungsschwerhörigkeiten (Otosklerose) (Wendler, 1987) oder mono- oder polysymptomatischen Fehlbildungen im Außen- und Innenohr ist die sensorineurale Schwerhörigkeit in der Gruppe der erblichen Schwerhörigkeit die häufigste Ursache. Sowohl für syndromale (z.B. Usher Syndrom) als auch für nicht-syndromale Schwerhörigkeit sind Gene bekannt, deren Mutation in Schwerhörigkeit resultiert.

Schwerhörigkeiten sind genetisch sehr heterogen, d.h. Veränderungen in zahlreichen, ganz unterschiedlichen Genen (siehe oben) führen zu gering differenzierten Phänotypen. Die Bedeutung polygener Ursachen, d.h. also die gleichzeitige Veränderung mehrerer Gene als Grundlage eines komplexen Phänotypes wird für Hörstörungen ebenfalls seit langem diskutiert, ohne dass hierfür eindeutige Daten letztlich beweisend wären. Prinzipiell ist nach allen Modellen möglich, dass ein Kind zweier schwerhöriger Eltern gesund sein kann, dass also Erbgänge im Einzelnen nicht exakt definiert werden können. Demzufolge stellte sich die Suche nach ursächlichen Genen dieser Störung schwieriger dar als für andere, klassisch monogene Krankheiten, z.B. Mukoviszidose.

Die geschätzte Zahl der Loci, die für Hörstörungen verantwortlich sind, wird sehr unterschiedlich angegeben: allein für den autosomal rezessiven Erbgang nicht-syndromaler Hörstörungen werden zwischen 30 und 100 unterschiedliche Loci verantwortlich geschätzt (Petit, 1996).

Insbesondere für nicht-syndromale Schwerhörigkeit ist hierbei eine große Anzahl von Genen für rezessive und dominante Loci bekannt. Diese Gene lassen sich nicht einer bestimmten Gruppe zuordnen. Es sind zum Beispiel mehrere unterschiedliche Connexin Gene beschrieben, allerdings auch Gene, die Kaliumkanäle exprimieren. Tabelle 4 gibt einen Überblick bekannter rezessiver und dominanter Loci für nicht-syndromale Schwerhörigkeit.

**Tabelle 4** nach v.Camp, ( <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>): bekannte Loci für Schwerhörigkeit

#### Dominante Loci mit bekannten Genen

Lokus	Gen	Literatur
DFNA1	DIAPH1	Lynch et al. 1997
DFNA2	GJB3 (Cx31)	Xia et al. 1998
DFNA2	KCNQ4	Kubisch et al. 1999
DFNA3	GJB2 (Cx26)	Kelsell et al. 1997
DFNA3	GJB6 (Cx30)	Grifa et al. 1999
DFNA5	DFNA5	Van Laer et al., 1998
DFNA8/ DFNA12	TECTA	Verhoeven et al., 1998
DFNA9	COCH	Robertson et al., 1998
DFNA10	EYA4	Wayne et al, 2001
DFNA11	MYO7A	Liu et al, 1997
DFNA13	COL11A2	McGuirt et al, 1999
DFNA15	POU4F3	Vahava et al. 1998
DFNA17	MYH9	Lalwani et al, 2000

#### Rezessive Loci mit bekannten Genen

DFNB1	GJB2 (Cx26)	Kelsell et al. 1997
DFNB2	MYO7A	Liu et al, 1997 Weil et al, 1997
DFNB3	MYO15	Wang et al., 1998
DFNB4	PDS	Li et al., 1998
DFNB8/ DFNB10	TMPRSS3	Scott et al, 2001
DFNB9	OTOF	Yasunaga et al., 1999
DFNB12	CDH23	Bork et al, 2001
DFNB21	TECTA	Mustapha et al, 1999
DFNB29	CLDN14	Wilcox et al, 2001

## 2.5 Connexine

Die in dieser Arbeit behandelte Schwerhörigkeit betrifft den Locus DFNB1 (Chromosom 13q 11-12). Auf diesem Locus befindet sich das Connexin26, welches in Fällen von sporadischer sensorineuraler Schwerhörigkeit für diese verantwortlich ist (Estivill et al., 1998). Für dieses Gen sind neben zahlreichen (derzeit 64) rezessiven auch sechs dominante (Stand April 2001) Mutationen publiziert. Dies hat nach der unter 2.4.1 aufgeführten Nomenklatur zur Folge, dass dieser Genlocus auch als dominante Mutation als DFNA3 auftaucht. Ein Überblick über derzeit bekannte Mutationen auf dem Connexin26 Gen sind im Anhang in Tabelle 5a und 5b aufgelistet.

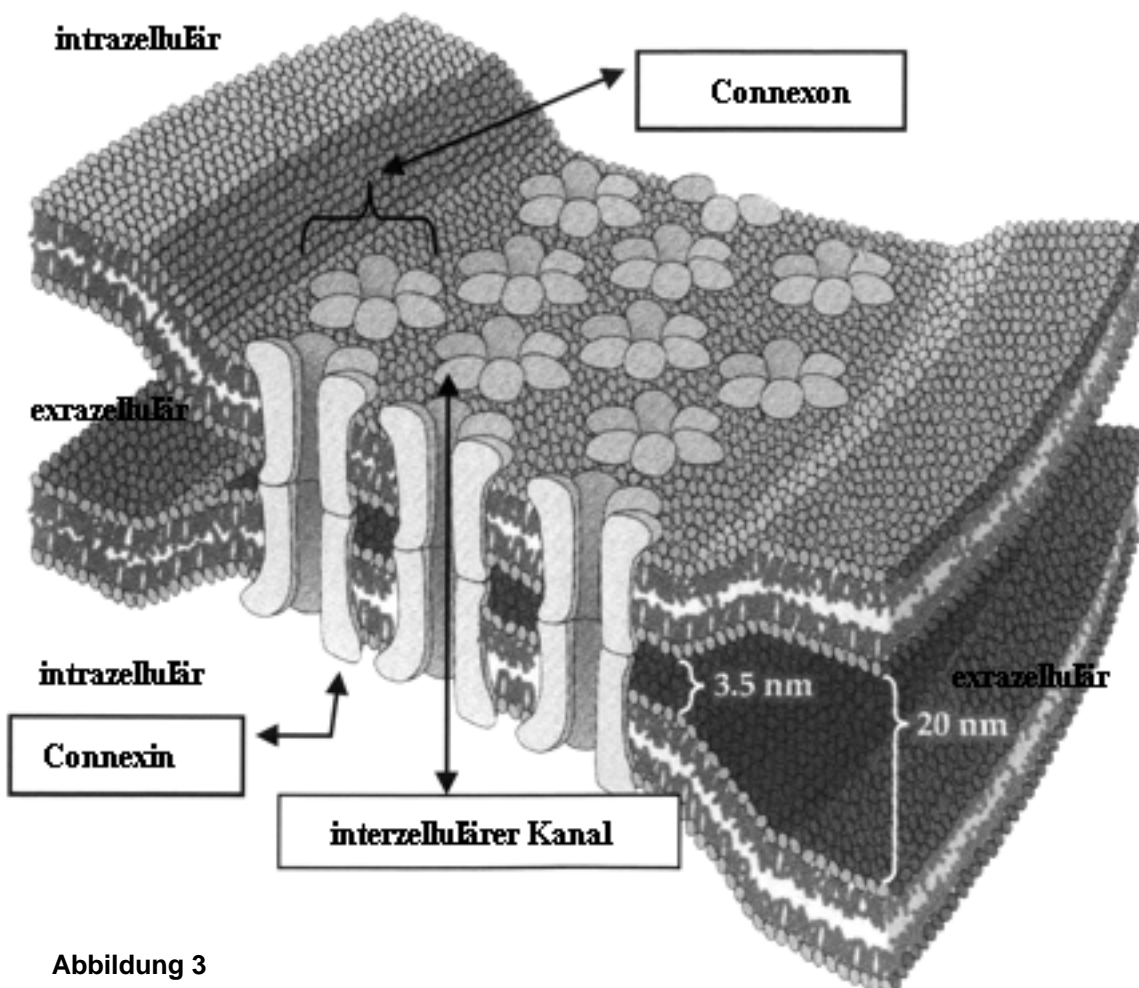
Connexine sind transmembranäre Proteine, die miteinander Kanäle bilden und somit einen schnellen Austausch von Ionen und kleineren Proteinen ermöglichen. Connexine werden in den verschiedenen Geweben und Zellen unterschiedlich exprimiert (Kumar, 1999).

Zur Bezeichnung der Connexine haben sich zwei Systeme etabliert. Während das erste auf das Molekulargewicht der einzelnen Connexine aufbaut, teilt das zweite System die Connexine in zwei Gruppen gemäss der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen ein (Kumar, 1999). In der Einteilung nach dem Molekulargewicht wird die Bezeichnung Connexin von einer Zahl gefolgt, die dem Molekulargewicht entspricht. Die Bezeichnung „Connexin26“ bedeutet, dass dieses Connexin ein Molekulargewicht von 26 kiloDalton (kD) hat. Häufig wird „Connexin“ dabei als „Cx“ abgekürzt. Cx26 steht für Connexin26. Demgegenüber werden Connexine anhand der strukturellen Einteilung in zwei Gruppen, Typ Alpha und Typ Beta getrennt. Die Nomenklatur bezeichnet das Connexin als „Gap-junction-protein“ – abgekürzt als GJ- mit der darauffolgenden Klasse „A“ oder „B“ des Connexins (für ein einzelnes Connexin der Maus (Cx36) wird von O’Brien eine weitere Klasse der Gamma-Connexine gefordert (O’Brien et al., 1996)). Die Zahl am Ende der Bezeichnung dient der Identifizierung. So wird zu Beispiel Cx26 gap-junction-protein-beta2 (GJB2) genannt, während Cx43 gap-junction-protein-alpha1 (GJA1) bezeichnet wird.

Alle Connexine der Beta-Gruppe haben eine größere Homologie untereinander als mit Connexinen der Alpha-Gruppe. Die Connexine der Beta-Klasse „Cx31“ (GJB3), „Cx30“ (GJB6) und „Cx26“ (GJB2) besitzen untereinander eine größere Homologie als jedes dieser mit „Cx43“ (GJA1).

### 2.5.1 Aufbau und Struktur von Connexinen und Gap Junctions

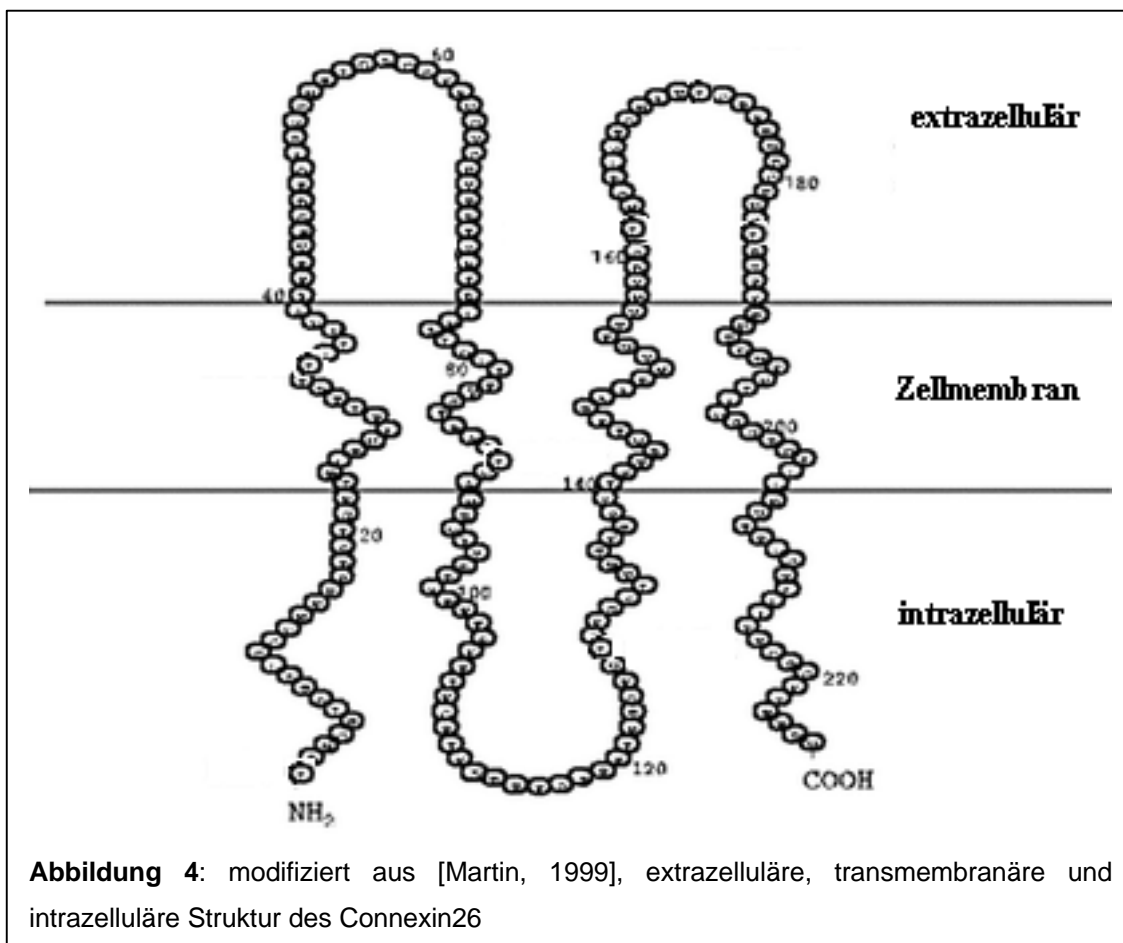
Ein Connexin, als Grundeinheit eines Connexons, ist ein Polypeptid. Es existieren unterschiedliche Connexine. Connexone bilden miteinander Gap Junctions. Gap Junctions sind Zonen interzellulärer Kontakte bei denen der interzelluläre Abstand auf 2-4 nm (Kumar, 1999) verringert ist. In diesen Zonen bilden sich Kanäle aus, über welche die Zellen kommunizieren können. Dabei wird von jeder Zelle eine Vielzahl von halben Kanälen (hemi-channels) gebildet, die in ihrer Vielzahl mit den Halb-Kanälen (hemi-channels) der anderen Zelle einen Gap Junction bilden (Evans et al., 1999) (Stebbing et al., 2000). Jeder dieser Kanäle besteht also aus zwei Halb-Kanälen (hemi-channels), die Grundeinheit dieser hemi-channels ist ein Connexin. Jeweils sechs Connexine bilden ein hemi-channel. In Anlehnung an diese Tatsache ist Connexon eine andere Bezeichnung für diese Hemi-channel. Einen Überblick über den Aufbau von Gap Junctions gibt Abbildung 3.



**Abbildung 3**

Nach Kemperman, MH, Figure 1(Kemperman, 2002): Aufbau eines Connexons aus mehreren Connexinen

Der Durchmesser eines Connexons wird auf ungefähr 65 Angstrom geschätzt, wobei sich die Connexine hexagonal anordnen. Ein Connexon besteht weiter aus 6 Connexinen. Man unterscheidet heterotypische von homotypischen Gap Junctions und heteromere von homomeren Connexonen. Ein homotypischer Gap Junction besteht nur aus einem Typ von Connexin, z.B. Connexin26, ein heterotypischer Gap Junctions aus mindestens zwei unterschiedlichen Connexinen, z.B. Connexin26 und Connexin30. Homomere Connexone bestehen wiederum nur aus einem Typ von Connexin, z.B. Connexin26, während heteromere Connexone mindestens von zwei Connexinen aufgebaut werden (z.B. Connexin26 und Connexin30) (White und Bruzzone, 1996). Es ist bekannt, dass die Membran der Zelle viermal von jedem Connexin-Protein durchbrochen wird, dabei liegen sowohl das N-terminale sowie auch das C-terminale Ende des Peptides auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Hieraus ergibt sich, dass zwei extrazelluläre Aminosäureketten, vier transmembranäre Anteile und drei cytoplasmatische Ketten existieren (siehe Abbildung 4) (Martin et al., 1999).





Connexine besitzen in unterschiedlichem Ausmass Sequenzhomologien untereinander. Es werden highly conserved regions von highly variable regions unterschieden (Sosinsky, 1996). Zu den hochkonservierten Regionen gehören die vier membranüberbrückenden Domänen und die zwei extrazellulären Domänen. Die cytoplasmatische Regionen werden zu den hochvariablen Regionen (=highly variable regions) gezählt. Funktionell kann man die Struktur der Connexine in drei Domänen einteilen (transmembranäre Domäne, extrazelluläre Domäne und intrazelluläre Domäne)

Diese Domänenstruktur determiniert die physiologischen Eigenschaften der einzelnen Connexine. Aus dem zuvor Geschriebenen geht hervor, dass die einzelnen Domänen von Connexin zu Connexin in Länge und Struktur variieren, somit also auch die physiologischen Eigenschaften der Connexine variieren. Bei dieser Einteilung sollte man sich jedoch vor Augen halten, dass es sich hierbei um eine stark vereinfachte Darstellung handelt. Es ist davon auszugehen, dass sich die einzelnen Domänen untereinander stark beeinflussen und in ihrer Funktion voneinander abhängig sind (Sosinsky, 1996).

## **2.5.2 Funktion der Connexine und Gap Junctions**

Gap Junctions dienen der interzellulären Kommunikation durch den interzellulären Austausch von Ionen und kleinen Proteinen bis zu einer Grösse von 1000 Da. Ihre Permeabilität wird dabei durch eine große Anzahl unterschiedlicher Faktoren geregelt (interzelluläres elektrisches Potential, Temperatur, intrazellulärer pH-Wert, intrazelluläres Kalzium, Tumor-Promoter, cAMP und viele andere) (Kikuchi et al., 1995). Ferner beeinflusst auch die Zusammensetzung der einzelnen Gap Junctions und Connexone die funktionellen Eigenschaften (homotypisch/heterotypisch, homomer/heteromer). Da sich die einzelnen Connexine durch diese Eigenschaften unterscheiden, wird durch die Zusammensetzung der Gap Junctions die Permeabilität verändert (Kikuchi, 1995). Auch die Expression spielt aufgrund der niedrigen Turnoverzeit der Connexine ebenso wie die Anordnung der Gap Junctions eine wichtige Rolle in der Steuerung der Permeabilität (Veenstra, 1996) (Sosinsky, 1996).

### **2.5.3 Rolle von Connexinen in der Ätiologie von Erkrankungen**

Abhängig von ihrer jeweiligen Expression und Interaktion in spezifischen Organsystemen, können Connexinstörungen die unterschiedlichsten Funktionsdefekte verursachen.

Die erste Störung, die einer Funktionsstörung eines Connexins zugeschrieben werden konnte, war die x-chromosomal vererbte Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung. Bei dieser peripheren Neuropathie, bei der es charakteristischer Weise zu einer Atrophie der distalen Muskeln kommt, wurde ein defektes Connexin32 festgestellt. Schwerhörigkeit kann mit der x-chromosomal vererbten Charcot-Marie-Tooth Erkrankung assoziiert sein. Bei einem sehr variablen Phenotyp sind zahlreiche Mutationen auf dem Connexin32 Gen bekannt, die der x-chromosomal vererbten Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung zugeschrieben werden können (Krutovskikh und Yamasaki, 2000).

Eine Rolle bei der Entstehung der kongenitalen Katarakt, insbesondere der zonular pulverulenten Katarakt, konnte dem Connexin46 und dem Connexin50 zugeschrieben werden (Lo et al., 1996)(Mackay et al., 1997) (Mackay et al., 1999).

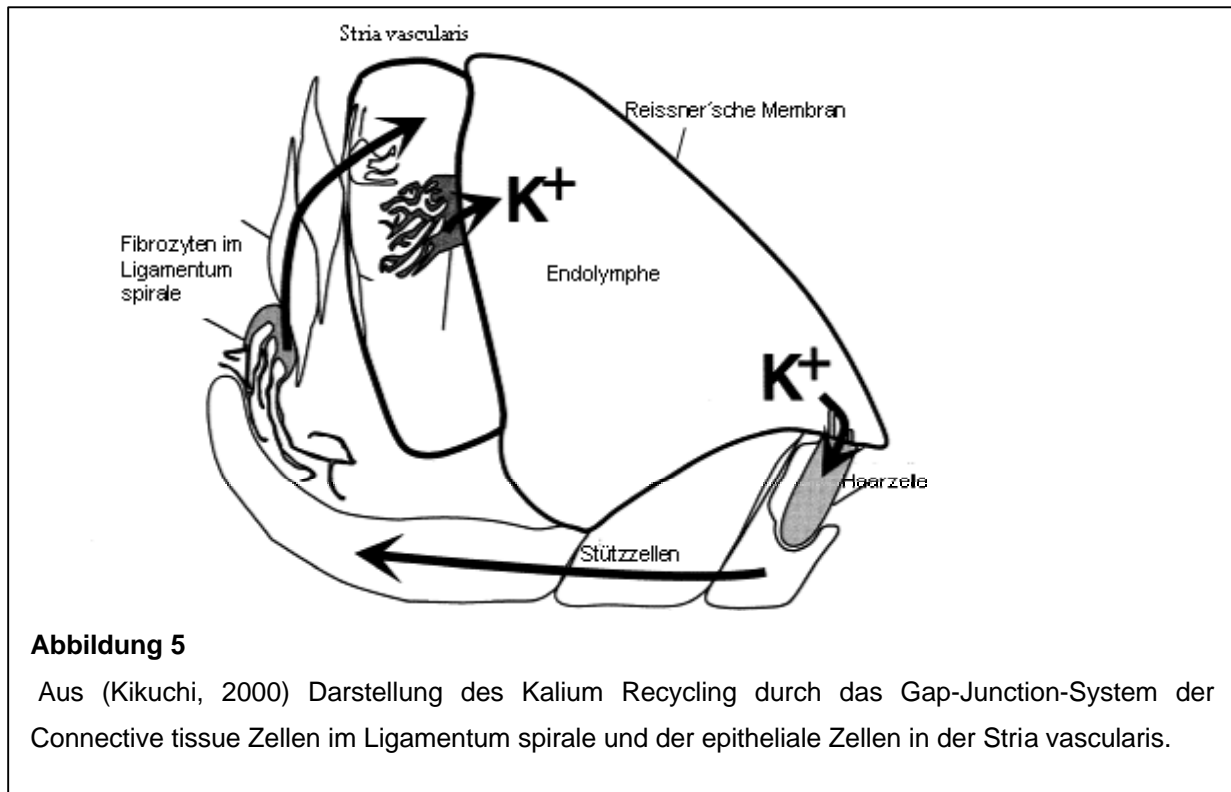
Mutationen auf dem Connexin43 Gen wurden in Fällen von Herzfehlbildungen mit kombiniertem Lateralisationsdefekt (Viszeroatriale Heteroataxie) beschrieben (Britz-Cunningham et al., 1995).

Syndromischen Formen von Schwerhörigkeit, die mit Hautstörungen assoziiert sind, konnte Connexin31-Mutationen zugeschrieben werden (Krutovskikh und Yamasaki, 2000). Auch Connexin26 Mutationen sind in Fällen von Keratitis-Ichthyosis-Taubheit Syndrom bekannt (Richard et al., 2002).

#### **2.5.3.1 Connexine im Hörorgan**

Verschieden Connexine werden im Innenohr des Menschen exprimiert (Forge, 1984)(Forge et al., 1999). Connexin26 (GJB2) spielt eine Rolle beim Kalium-Recycling-Pathway. Nach Untersuchungen von Santos-Sacchi (Santos-Sacchi, 1991) kommunizieren Cochlea-Stützzellen durch Kalium-Kanäle in (funktionellen) Gap Junctions miteinander. Kalium wird bei der Erregung der Haarzellen in die Perilymphe abgegeben und kann durch das epitheliale Gap-junction-system zur stria vascularis abtransportiert werden, wo es in der Endolymphe recycled wird. Hierbei spielt allem Anschein nach die Interaktion unterschiedlicher Zell-Typen (Connective tissue, Epithelial cell) und deren Gap Junction Systemen eine wichtige Rolle (Kikuchi et al., 1995) (Kikuchi et al., 2000). Demzufolge kann bei einem defekten

Connexin26-Produkt-als einem Teil des Gap-junction-Systemes- das elektrische Potential zwischen Endolymphe und Perilymphe nicht mehr aufrechterhalten werden.



Klinische Beobachtungen ergaben, dass Patienten, die eine Mutation auf dem GJB2 Gen aufweisen, keine vestibulären Symptome zeigen (Forge et al., 1999). Dies ist insofern auffällig, da bei den vestibulären Prozessen ebenfalls das Potential zwischen Endolymphe und Perilymphe eine wichtige Rolle im Wahrnehmungsprozess spielt (Forge et al., 1999). Diese scheinbare Divergenz erklärt man sich dadurch, dass im vestibulären System dieses Potential durch ein anderes, dort spezifisch exprimiertes Connexin aufrechterhalten wird (Forge et al., 1999).

Tiermodelle können wichtige Informationen zur weiteren funktionellen Charakterisierung von Connexin26 liefern. Homozygote Cx26-knock-out Mäuse verstarben allerdings intrauterin und gaben einen Hinweis darauf, dass Connexin26 auch eine Rolle in der Embryogenese besitzt (Willecke et al., 1999).

Eine Untersuchung der humanen Verhältnisse im Innenohr von Patienten mit Connexin26 assoziierter Schwerhörigkeit wurde von Andrew Jun et al. vorgenommen. In histologischen Schnitten des cochleären Systems eines verstorbenen schwerhörigen Patienten, welcher ein defektes CX26 Gen aufwies, konnte eine Degeneration der Haarzellen, eine veränderte Tectorialmembran und eine Atrophie der Stria vascularis gefunden werden. Ferner zeigte sich,

dass an Stelle der atrophischen Stria vascularis eine zystische Struktur vorhanden war (Jun et al., 2000).

### **2.5.3.2 Connexin26 (GJB2)**

Das Connexin26 Gen wird für die Genese eines Teils der Schwerhörigkeiten verantwortlich gemacht. 1995 wurde von Guilford et al. die Lage des autosomal rezessiven Locus DFNB1 auf dem Chromosom 13q nahe der perizentromeren Region (genau auf 13q12-13) durch Homozygotitäts-Mapping einer konsanguinen tunesischen Familie bestimmt (Guilford et al., 1995). Weitere Studien von Maw et al., Brown et al. und Gasparini et al. konnten in den darauffolgenden Jahren bereits feststellen, dass eine Verknüpfung der Schwerhörigkeit zu Locus DFNB1 in unterschiedlichen Populationen (keltische, südeuropäische und kaukasische Population) unterschiedlich häufig vorkommt (Maw et al., 1995) (Brown et al., 1996) (Gasparini et al., 1997). In diesen Studien konnte der Locus weiter auf 14cM eingegrenzt werden (Guilford, 1995). Vier Jahre nach der Erstbeschreibung durch Guilford, 1997, gelang es sowohl Kelsell et al. (Kelsell et al., 1997) als auch Brown et al. (Brown, 1996) ein Kandidaten-Gen für den Locus DFNB1 und DFNA3, welcher zuvor von Chaib et al. (Chaib et al., 1994) auf denselben Locus wie DFNB1 lokalisiert worden war, zu präsentieren. Dabei handelte es sich um das Connexin26 Gen, welches bereits vorher von Willecke et al. und Mignon et al. (Willecke et al., 1990) (Mignon et al., 1996) in der entsprechenden Region beschrieben worden war. Die Anwesenheit von Gap Junctions im Hörorgan, die Connexin26 enthalten, war zuvor von Kikuchi et al. bewiesen worden (Kikuchi et al., 1995). Die Existenz einer dominanten Mutation auf dem Connexin26 Gen wird von unterschiedlichen Autoren angezweifelt (Scott et al., 1998) (Gabriela, 1998) (White et al., 1998) (Wilcox et al., 1999). In Arbeiten, die Connexin26 Mutationen in Fällen autosomal rezessiver und sporadischer Schwerhörigkeit untersuchten (Zelante et al., 1997) stellten sich zum einen starke Unterschiede in den einzelnen Populationen und Patientengruppen dar, zum anderen zeigte sich, dass der größte Anteil der Mutationen von einer einzigen Mutation, namentlich der Gdel35, hervorgerufen wird (Zelante et al., 1997; Carrasquillo et al., 1997; Denoyelle, 1997; Estivill et al., 1998; Lench et al. a), 1998; Lench et al. b), 1998; Green et al., 1999; Storm et al., 1999; Kupka et al., 2000; Gabriel et al., 2001).

Tabelle 5a und 5b im Anhang stellt die zum gegenwärtigen Zeitpunkt bekannten Mutationen auf dem Connexin26 Gen dar. Es kommen dominante und rezessive Mutationen vor.

Diese Mutationen treten genotypisch als heterozygote, compound heterozygote und homozygote Fälle auf. Tabelle 6 stellt die einzelnen Möglichkeiten der zugrundeliegenden Genotypen des Exon2 des Connexin26 Genes dar.

**Tabelle 6:** Aufführung der unterschiedlichen möglichen Vorliegensweisen von Mutationen

Heterozygot	Heterozygot definiert in dieser Arbeit eine Mutation auf einem Allel des Exon2 des Connexin26 Genes, während das andere Allel dieses Genes als Wildtyp - also unverändert- vorliegt (Eine Mutation auf Exon1 des Connexin26 Genes wird durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden nicht erfasst.).
Compound Heterozygot	Während auf Allel 1 des Exon2 des Connexin26 Genes eine definierte Mutation vorliegt, findet sich auf Allel 2 dieses Genes (Exon2 in dieser Arbeit) eine andere- von der Mutation auf Allel 1 unterschiedliche Mutation. Im Unterschied zum heterozygoten Genotyp wären in diesem Fall beide Mutationen eines rezessiven Erbganges erfasst.
Homozygot	Homozygot bedeutet in dieser Arbeit, dass beide Allele das gleiche Mutationsmuster auf Exon2 des Connexin26 Genes besitzen.

Bei der Erkrankung Schwerhörigkeit scheint auch der sogenannte compound Genotyp eine wichtige Rolle zu spielen (White et al., 1998) (Reardon und Mueller, 2000; Houseman et al., 2001) (siehe Tabelle 7). Dieser Genotyp ist die Grundlage einer digenischen Erkrankung. Ein Beispiel für einen digenischen Vererbungstyp ist die Retinopathia pigmentosa, bei der Mutationen auf dem Peripherin/RDS Gen mit dem nicht assoziierten (unlinked) ROM1 Lokus für bestimmte Fälle von Retinopathia pigmentosa verantwortlich sind (Kajiwara et al., 1994).

Compound Genotype	Innerhalb der gesamten cDNA des Connexin26 Genes (Exon 1 und Exon 2) findet sich nur eine singuläre Mutation. Zusätzlich findet sich auf einem weiteren Gen, welches unter Umständen in funktionellem Zusammenhang mit dem Connexin26 Gen stehen kann, eine singuläre Mutation.
-------------------	---

**Tabelle 7:** Erklärung des Compound Genotypes

Häufige, mit Schwerhörigkeit assoziierte Mutationen im Connexin26 Gen sind:

**Gdel35:** Bei der Mutation Gdel35 kommt es zu einer Deletion eines Guanin an Stelle 35 der Nukleinsäuresequenz des Exon2 des Connexin26 Gens. Zum Teil wurde die Mutation auch in früheren Arbeiten als Gdel30 beschrieben, da an dieser Stelle (von bp30 bis bp 35) sechs Guanin hintereinander vorkommen. Die Gdel35 Mutation bewirkt einen Frameshift und führt zu einem verfrühten Stop der Aminosäuresynthese bei Aminosäure 12 (Carrasquillo et al., 1997). Mutationen werden heterozygot, compound heterozygot und homozygot beschrieben (Zelante, 1997; Green, 1999).

**M34T:** Diese Mutation befindet sich an Stelle bp 101 des Exon2. In der Proteinsequenz wird Methionin an Stelle 34 durch Threonin (Scott et al., 1998) ersetzt. Diese Mutation ist auch unter 101 T-C bekannt. Erstmalig beschrieben diese Mutation Kelsell et al. 1997 (Kelsell et al., 1997). Sie beobachteten einen autosomal dominanten Erbgang. Scott et al. konnten durch Untersuchung einer Familie, bei der M34T Mutationen heterozygot vorlagen, belegen, dass diese Mutation nicht alleine für die Schwerhörigkeit verantwortlich ist (Scott et al., 1998) und nahmen an, dass hier eher eine Allelvarianz vorliegt. Wenig später stellten White et al. (White et al., 1998) fest, dass unter in vitro Bedingungen die M34T Allelvariante eine dominante Inhibition auf die Aktivität der Wildtyp-Variante ausübte (paired-oocytes-Test). Die Arbeitsgruppe um Hausmann stellte 2001 fest, dass in über 80% der M34T Heterozygoten, die von Schwerhörigkeit betroffen sind, eine zusätzliche Mutation (del10) auf dem noncoding exon 1 des Connexin26 Genes gefunden werden konnte. Da unterschiedliche Beobachtungen in den einzelnen Untersuchungen zu dieser Mutation gemacht wurden (Kelsell et al., 1997;

Scott et al., 1998; White et al., 1998; Houseman et al., 2001), konnte nicht endgültig geklärt werden, ob es sich bei dieser Mutation um eine Allelvariante handelt, oder, ob dieser Mutation ein rezessiver oder gar dominanter Erbgang zugrunde liegt. Letzte Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mutation nur in Kombination mit einer 10del in Exon1 (noncodingexon) zur manifesten Schwerhörigkeit führt (Houseman et al., 2001).

**105 (314-327del(14)):** Diese Mutation führt zu einer Deletion von 5 Aminosäuren mit einem anschließenden Frameshift, der nach weiteren sechs Aminosäuren in einem vorzeitigen Stop-Codon endet (Kelley et al., 1998). Sie wurde in vorausgegangenen Arbeiten heterozygot beschrieben, wobei in einigen Fällen noch eine zweite Mutation im Sinne eines compound heterozygoten Genotyps identifiziert werden konnte (Kelley et al., 1998). Die Mutation ist somit nach den vorliegenden Daten am ehesten eine rezessiv wirksame Veränderung.

Bei der Sequenz von bp 290 bis bp 350 des Wildtypes kommt es bei der Mutation zum Ausfall der Sequenz 5' GGAAGTTCATCAAG 3' des kodierenden Stranges. Dabei ergibt sich ein Nomenklatur-Problem: Da die deletierte Sequenz sowohl am 5' mit GG beginnt und die Sequenz nach der Deletion mit 5'GG fortsetzt, könnte theoretisch der deletierte Abschnitt auch lauten 5'AAGTTCATCAAGGG 3'. Hierdurch würde der Beginn der Deletion auf Stelle 316 verlagert. Da das Genprodukt aber identisch bleibt, wird diese Mutation in dieser Arbeit wie von ihrem Erstbeschreiber 314-327del(14) bezeichnet.

### **2.5.3.3 Andere Connexine**

Neben Connexin26 gibt es noch andere Connexine, die im Hörorgan exprimiert werden und die bei Schwerhörigkeit eine Rolle spielen. So konnten sowohl für dominant als auch für rezessiv vererbte Fälle Mutationen auf dem Connexin31, Connexin30 und dem Connexin43 Gen nachgewiesen werden (Xia et al., 1998; Grifa et al., 1999; Liu et al., 2001; Liu et al., 2000). Ein Beispiel, dass Connexine als compound Genotype miteinander interagieren, konnte für die Mutation Gdel35 auf dem Connexin26 Gen in Kombination mit einer Mutation auf dem Connexin30 Gen gezeigt werden (Lerer et al., 2001).

### **3. Aufgabenstellung**

In Voruntersuchungen wurden stark schwankende Prävalenzen von DFNB1-assoziiierter Schwerhörigkeit (10% –58%) in verschiedenen Populationen beschrieben. Insbesondere wurde ein hoher Anteil der Mutation Gdel35 bei Patienten mit sporadischen Hörstörungen speziell im Mittelmeerraum beobachtet (Lench et al., b, 1998; Estivill et al., 1998). Dies führte zu einer Diskussion, ob die Erfassung dieser Mutation eine Rolle in der Frühdiagnostik kongenitaler und frühkindlicher Hörstörungen, unabhängig von einer Familienanamnese, spielen sollte.

Für eine eventuelle diagnostische Anwendung des Mutationsnachweises ist die Erhebung valider Daten zur genetischen Epidemiologie in der Zielbevölkerung unerlässlich. Für den deutschen Raum lagen zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit keine entsprechenden Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war, die Prävalenz von Mutationen auf dem einzigen kodierenden Exon2 von Connexin26 in einem deutschen Patientengut zu ermitteln und mit denen anderer Populationen zu vergleichen. Grundlage war die Untersuchung der Patienten der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie der Universität Münster. Untersucht wurden dabei sporadische und familiäre Fälle der kongenitalen und frühkindlichen nicht-syndromalen Schwerhörigkeit.



## **4 Patienten und Methoden**

### **4.1 Patienten**

Es wurden 105 schwerhörige Patienten aus 87 Familien untersucht. Die Patienten wurden aus dem Krankengut der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie der Universität Münster rekrutiert. Von jedem Probanden wurden 5 ml EDTA Blut asserviert und zusammen mit einem standardisierten Fragebogen in das Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena geschickt.

#### **4.1.1 Einschlusskriterien**

Folgende Einschluss-Kriterien waren zu erfüllen:

- 1) Vorliegen einer sporadischen oder familiären Hörstörung.
- 2) Vorliegen einer nonsyndromalen Hörstörung.
- 3) Behandlung/ Beratung an einer deutschen Klinik.
- 4) Beschreibung der Diagnose durch einen Pädaudiologen.
- 5) Detaillierte Anamnese zum Ausschluss andere Schwerhörigkeit-verursachenden Faktoren.

In der Annahme, dass eine genetisch bedingte Hörstörung sich beidseitig manifestieren müsste, wurden zunächst nur beidseitig betroffene Patienten in die Studie aufgenommen. In der zu einem späteren Zeitpunkt erschienenen Studie von Denoyelle et al. (Denoyelle et al., 1999) wurden auch Fälle beschrieben, die eine unterschiedlich ausgeprägte Lateralisation aufwiesen. Deswegen erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (ab Mai 1999) auch die Aufnahme von Patienten, die eine Lateralisation der Schwerhörigkeit aufwiesen.

#### **4.1.2 Schriftliche Einverständniserklärung**

Das Vorliegen einer schriftlichen unterschriebenen Einverständniserklärung nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Information von Eltern bzw. Patienten war Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie. Die Einverständniserklärung ist im Anhang aufgeführt.

### **4.1.3 Anonymisierung der Daten**

Die Patienten wurden vorher darüber aufgeklärt, dass Studienbefunde nur im Rahmen einer genetischen Beratung an den zuständigen Betreuer übermittelt werden würden. Zudem wurde darauf Wert gelegt, dass Untersuchungen für diagnostische Fragestellungen nur außerhalb der Studie mit diagnostischer Probenentnahme und – identifikation durchgeführt werden. Um die datenschutzrechtlichen Vorgaben zu gewährleisten und keinem der Patienten ein Nachteil aus der Teilnahme zu schaffen, wurden für die Studie sämtliche Daten anonymisiert. Namen und eine fortlaufende Nummer wurden zusammen mit allen anderen in das Zentrallabor eingehenden Proben notiert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nur mit den Namen zugeordneten Nummern gearbeitet. Jeder Patient konnte seine erteilte Einwilligung an der Teilnahme zu jedem Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen zurückziehen, ohne dass ihm daraus Nachteile entstanden.

### **4.1.4 Standardisierter Fragebogen zur Datenerhebung**

Zur Erhebung der Daten wurde ein Fragebogen entworfen, der im Wesentlichen folgende Aspekte abdeckte:

- 1) Aufklärung der Patienten bzw. deren Eltern über die Studie
- 2) Nennung verschiedener Ansprechpartner für eventuelle Rückfragen.
- 3) Standardisierte Anamnese zum Kontrollieren der Einschlusskriterien.
- 4) Standardisierte pädaudiologische Befunderhebung.
- 5) Dokumentation der Einverständniserklärung der Patienten oder deren Eltern.

Der Fragebogen ist im Anhang aufgeführt.

### **4.1.5 Untersuchte Probandengruppen**

Es wurden 105 schwerhörige Patienten und 10 Kontrollen untersucht. Als Kontrollen wurden Individuen mituntersucht, bei denen keine offensichtliche Hörstörung vorlag (n= 10).

Bei insgesamt 87 Patienten und bei den 10 Kontrollen wurde das gesamte Exon2 des Connexin26 Genes sequenziert. Bei den verbleibenden 18 Verwandten von untersuchten Patienten wurde auf die vollständige Sequenzierung verzichtet.

Insgesamt setzte sich die untersuchte Gruppe folgendermaßen zusammen:

Kontrollen	10
Patienten insgesamt (Patientengruppe 1)	105
Nicht verwandte Patienten (Patientengruppe 2)	87

**Tabelle 8:** Zusammenstellung der untersuchten Patienten

In Patientengruppe 1 waren somit alle von Schwerhörigkeit betroffenen Patienten zusammengefasst. Da in dieser Gruppe aber auch Geschwister und Familienangehörige vorhanden waren, kann diese Gruppe nur für eine Betrachtung des Phänotyps, nicht aber der Prävalenzen herangezogen werden.

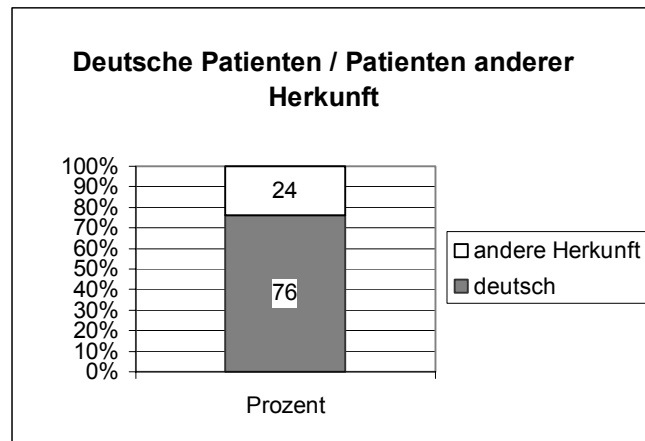
In Patientengruppe 2 (nicht verwandte Patienten) waren sporadische in 39% und familiäre Erbgänge in 44% vorhanden. In 16% der Fälle konnte keine Familienanamnese erhoben werden. Gründe hierfür lagen in Adoption sowie in vereinzelt unvollständigen Angaben.

#### **4.1.6 Charakterisierung der Patienten**

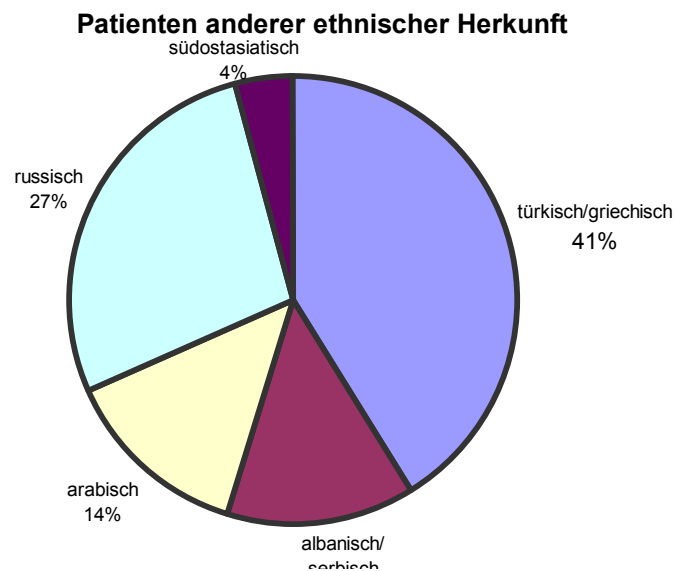
##### **4.1.6.1 Geographische Herkunft**

Für diese Betrachtung wird Patientengruppe 2 zugrunde gelegt. In den vorrausgegangenen Arbeiten waren unterschiedliche Prävalenzen der Mutationen auf dem Connexin26 Gen in den einzelnen geographischen Populationen aufgetreten. Um eine mögliche Beeinflussung der in dieser Arbeit vorgefundenen Prävalenzen durch unterschiedliche Bevölkerungsgruppen auszuschließen, wurde die Patientengruppe nach ihrer geographischen Herkunft unterteilt. Diese Einteilung ist nur eine Annäherung an die ethnische Herkunft der Patienten, die für Rückschlüsse auf den Ursprung der Mutation eigentlich von Bedeutung wäre. Wegen der häufigen Horizontalmigration (Umzug/Zuwanderung) können keine validen Rückschlüsse auf ethnische Gruppierungen gezogen werden. Alle Patienten, die seit mehr als zwei Generationen in Deutschland ansässig waren, wurden zur Gruppe der Patienten mit deutscher Herkunft gezählt. Alle in der Untersuchung eingeschlossenen Patienten hatten ihren Wohnsitz in Deutschland. In der Gruppe der nicht verwandten Patienten (Patientengruppe 2, Tabelle 8) überwogen Patienten, die eine gesicherte deutsche Herkunft hatten.

In der Gruppe der Patienten anderer Herkunft war der Anteil der Patienten mit Herkunft aus mediterranen Gebieten am größten (24%), zum anderen fiel ein großer Anteil Patienten russischer Herkunft (ehemalige GUS Staaten, keine genaueren Angaben) (27%) auf (Abbildung 6 und 7).



**Abbildung 6:** Anteil von Patienten mit gesicherter deutscher Herkunft über 2 Generationen am untersuchten Patientengut



**Abbildung 7:** Verteilung der Abstammung der Patienten mit einer nicht deutschen Herkunft.

Diese Daten lassen sich wie in Tabelle 9 zusammenfassen. Es zeigt sich, dass die untersuchten Patienten überwiegend mitteleuropäischer Herkunft waren.

mitteleuropäisch	78%
südosteuropäisch	18%
nichteuropäisch	4%

**Tabelle 9:** Grobe geographische Einteilung. Die Gruppe der südosteuropäischen Patienten besteht aus Patienten russischer, türkischer, griechischer, serbischer und albanischer Abstammung.

Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien herzustellen, wurde die Gruppe der südosteuropäischen (türkisch/griechisch, albanisch/serbisch) Patienten als „mediterrane“ Gruppe zusammengefasst.

#### 4.1.6.2 Ausmaß der Schwerhörigkeit

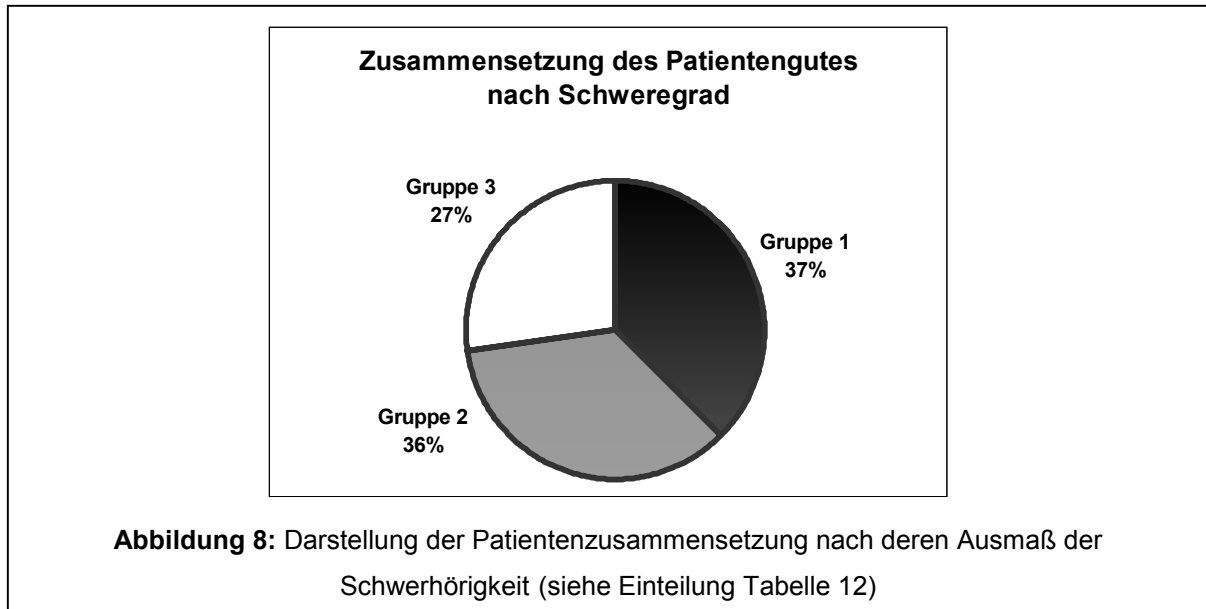
Im Folgenden wird die untersuchte Patientengruppe nach dem Ausmaß der Schwerhörigkeit dargestellt. Dazu wurde die Schwerhörigkeit der Patienten gemäss der in Tabelle 1 (Einleitung) dargestellten Einteilung gruppiert. Der besseren Übersicht halber wurden die Patienten anschließend in drei Gruppen zusammengefasst.

Gruppe	Ausmaß der Schwerhörigkeit
Gruppe 1	Hochgradig oder Hörrestigkeit
Gruppe 2	Mittelgradig oder mittel- bis hochgradig
Gruppe 3	Geringgradig oder gering- bis mittelgradig

**Tabelle 10:** Einteilung der Patienten in drei Gruppen nach deren Ausmaß der Schwerhörigkeit.

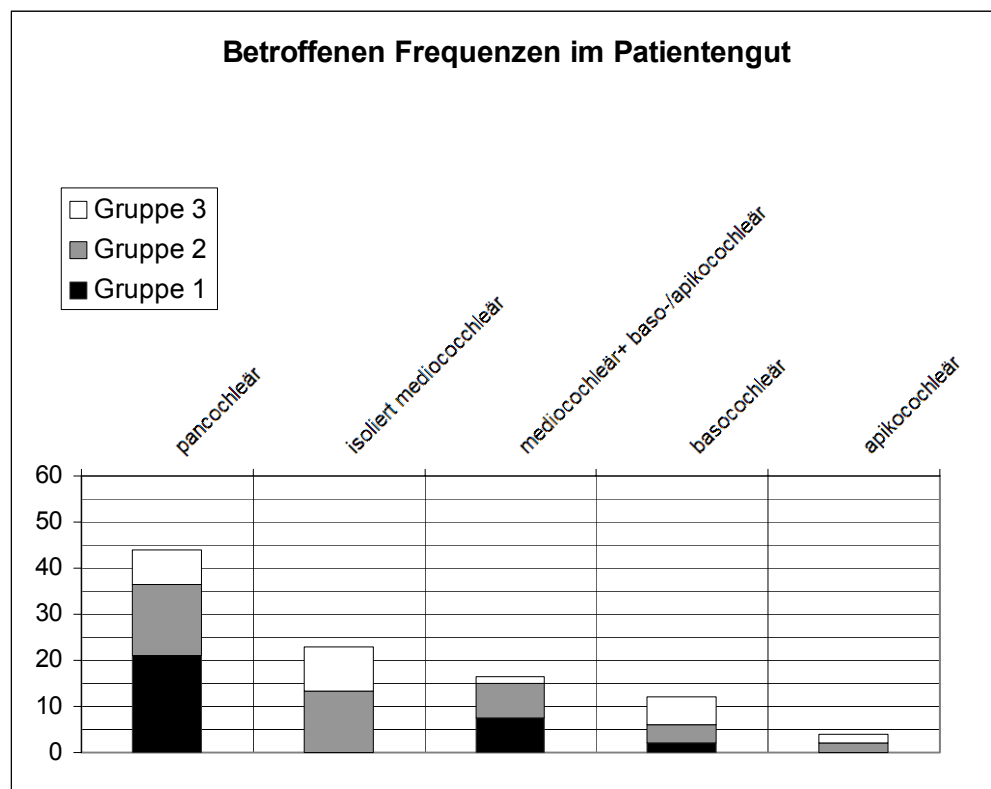
Diese Zusammenstellung beinhaltet nur beidseitig betroffene Patienten und Patienten der Asymmetriegruppe 2 (siehe Tabelle 11), da bei den offensichtlich einseitig betroffenen Patienten in den meisten Fällen keine Aussage zum Ausmaß der Schwerhörigkeit getroffen wurde.

Anhand dieser Einteilung lässt sich die Zusammensetzung der hier untersuchten Patientengruppe wie in Abbildung 8 darstellen. Es fällt eine relativ gleichmäßige Verteilung der einzelnen Schwerhörigkeitsgrade auf, lediglich Patienten mit einer geringgradigen Schwerhörigkeit sind leicht unterrepräsentiert.



#### 4.1.6.3 Betroffene Frequenzen

Wichtig für die Diskussion unterschiedlicher Prävalenzen in den einzelnen Studien ist die Darstellung der Schwerhörigkeiten nach den betroffenen Frequenzen, da sich durch vorherrschen eines bestimmten Phänotypes in einer Studie unterschiedliche Prävalenzen ergeben könnten. Abbildung 10 gibt einen Aufschluss über die generelle Zusammensetzung der Patientengruppe bezüglich der betroffenen Frequenzen. Es fällt auf, dass ein Phänotyp bei dem zumindest die mediocochleären Frequenzen betroffen sind, den Großteil der Phänotypen ausmacht. Die Einteilung bezüglich der Gruppen entspricht Tabelle 10.



**Abbildung 9** Darstellung der Patienten nach den betroffenen Frequenzen (in Prozent) mit Darstellung der Schweregrade (Einteilung siehe Tabelle 10).

#### 4.1.6.4 Asymmetrie

Von 105 dokumentierten Fällen unserer Studie wiesen 14 Patienten (13%) eine Asymmetrie der Schwerhörigkeit auf. In dieser Arbeit soll die von Denoyelle (Denoyelle et al., 1999) dargestellte Einteilung der Lateralisation modifiziert verwendet werden. Die Modifikation ergibt sich aus dem bereits in der Einleitung erläuterten Problem der unterschiedlichen zugrunde liegenden Einteilungen des Ausmaßes der Schwerhörigkeit. So legen unterschiedliche Autoren den einzelnen Graden der Hörstörung gering abweichende Hörverlust-Grenzen (in dB) zugrunde. Englische und deutsche Einteilungen basieren häufig auf unterschiedlichen Hörverlust-Grenzen.

<b>Lateralisationsausmaß</b>	<b>Grad 0</b>	<b>Grad 1</b>	<b>Grad 2</b>	<b>Grad 3</b>
<b>Anzahl</b>	91	1	0	3

**Tabelle 11:** Einteilung der Patienten in Assymetriegruppen.

Grad 0 = gleicher Grad der Schwerhörigkeit auf beiden Ohren.

Grad 1 = Unterschied der Schwerhörigkeit beider Ohren beträgt ein Grad (z.B. geringgradig auf einem Ohr und mittelgradig auf dem anderen)

Grad 2 = Unterschied der Schwerhörigkeit beider Ohren beträgt zwei Grad (z.B. geringgradig auf einem Ohr und mittel-hochgradig auf dem anderen Ohr)

Grad 3 = Unterschied der Schwerhörigkeit beider Ohren drei oder mehr als drei Grad (z.B. geringgradig auf einem Ohr und hörrestig auf dem anderen, oder geringgradig auf einem Ohr und hochgradig auf dem anderen Ohr)

Die Abweichung der Patientenzahlen in Tabelle 11 ergeben sich aus der oben aufgeführten Tatsache, dass bei den einseitig betroffenen Patienten meistens keine Bewertung des Ausmaßes erfolgte.

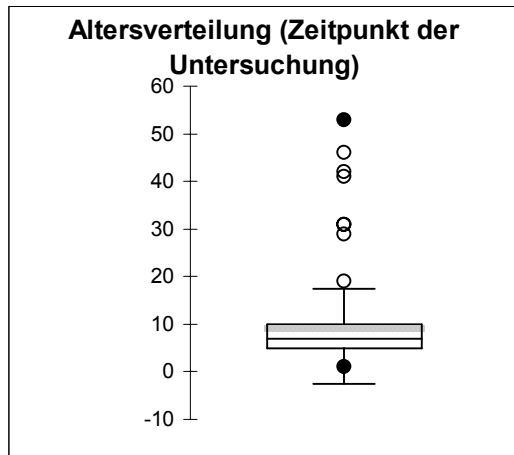
Interessanterweise wurde bei Patienten, die eine Lateralisation aufwiesen, häufiger eine sporadische Form der Hörstörung vorgefunden (86% sporadische Fälle). Im Vergleich dazu fanden sich in der Gruppe der beidseitig erkrankten Patienten nur 55% offensichtlich sporadische Fälle.

#### **4.1.6.5 Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung bzw. zum Zeitpunkt des erstmaligen Verdachts**

Es wird im Folgenden das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Untersuchung zur Aufnahme in die Studie und das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnose betrachtet. Bei der Auswertung des Alters zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnose fielen Unterschiede in den Gruppen der Lateralisation und der einzelnen Gruppen des Schweregrades der Schwerhörigkeit auf. Auch in den Gruppen des unterschiedlichen Ausmaßes der Schwerhörigkeit konnten Unterschiede festgestellt werden.

Zur Beschreibung der Durchschnittsalter wurde der Median gewählt.

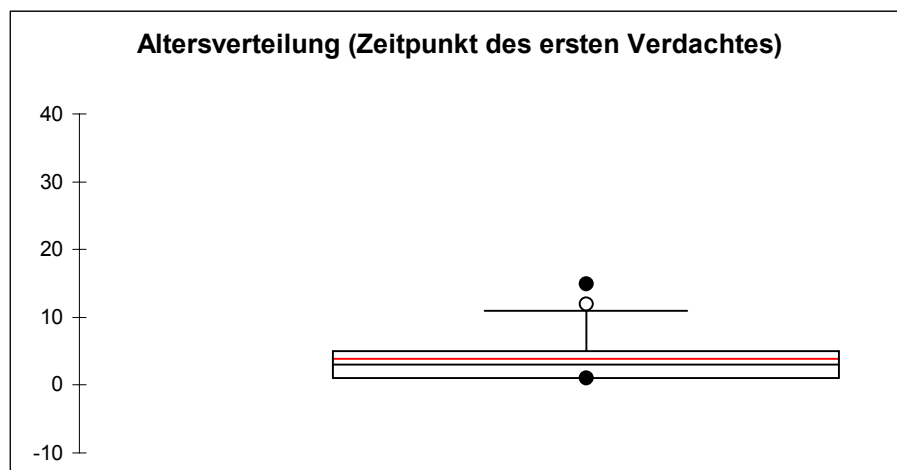




**Abbildung 10:** Verteilung des Alters zum Zeitpunkt der Untersuchung

Boxplot-Darstellung (Abbildung 10) der Verteilung des Alters der Patienten. Stichtag war jeweils der 31.12. des Jahres (1997-2000), in dem der Patient in die Studie aufgenommen wurde. Der Mittelwert (graue, dicke Linie) liegt bei 9,2 Jahren, der Median bei 7,0 Jahren.

Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose in der Gesamtgruppe (Patientengruppe 2, Tabelle 8) stellt sich folgendermaßen dar:

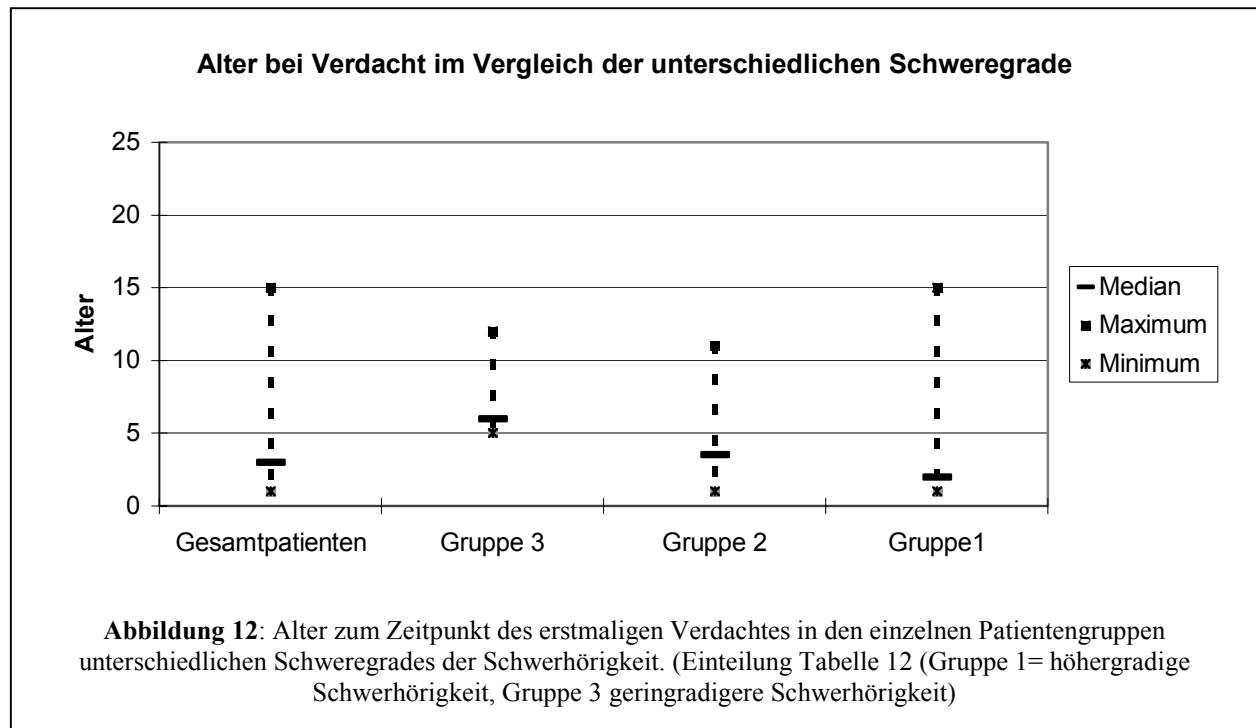


**Abbildung 11:** Alter zum Zeitpunkt des ersten Verdachtes der Schwerhörigkeit

Median des Alters bei erstmaligen Verdacht liegt bei 3,0 Jahren.

**Tabelle 12:** Median des Alters der einzelnen Gruppen mit unterschiedlich ausgeprägter Schwerhörigkeit (Gruppeneinteilung siehe Tabelle 10):

	Gesamtgruppe	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Median	3 Jahre	2 Jahre	3,5 Jahre	6 Jahre



Im Vergleich der Gruppen der unterschiedlichen Ausmaße der Schwerhörigkeit (siehe Tabelle 10) fallen Unterschiede bezüglich des Medians des Alters zum Zeitpunkt des Verdachtes auf (Abbildung 12).

Während in der Gruppe 1 (siehe Tabelle 10) der Median des Alters bei erstmaligem Verdacht noch bei 2 Jahren liegt, stellt man in der Gruppe der weniger ausgeprägten Schwerhörigkeit einen mit abnehmender Schwerhörigkeit sinkenden Median fest (Tabelle 12, Abbildung 12).

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Klinische Phänotypisierung**

Die klinische Phänotypisierung der Patienten erfolgte durch Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie der Universität Münster.

#### **4.2.1.1 Audiometrie**

##### **4.2.1.1.1 Reintonaudiometrie**

Von allen Patienten wurden Reintonaudiogramme durch einen Pädaudiologen oder Pädaudiologieassistenten erstellt.

##### **4.2.1.1.2 Hirnstammaudiometrie**

Bei Patienten, bei denen keine Reintonaudiometrie durchgeführt werden konnte, wurde die Hörfunktion mit einer Hirnstammaudiometrie untersucht. Diese Untersuchung im Notched-Noise Modus gewährleistete eine seitengetrennte, frequenzspezifische Aufzeichnung.

## 4.2.2 Molekulargenetische Methoden

### 4.2.2.1 Verwendete Lösungen

TAE Laufpuffer für Elektrophorese:

Tris HCl	40 mmolar
Eis-Essig	25 mmolar
EDTA	2 mmolar
pH	8,3

#### ***TBE-Puffer (10-fach)***

Tris base	108 g/l
Bohrsäure	55 g/l
EDTA	10 g/l

#### ***Lysis-Puffer***

NH <sub>4</sub> Cl	77.5 mmolar
KHCO <sub>3</sub>	0,1%

#### ***SDS-Puffer***

NaCl	0.45 mmolar
EDTA	15 mmolar

#### ***Ethidiumbromid-Färbegrad***

Ethidium-Bromid	1,25mg / 1 l H <sub>2</sub> O
-----------------	-------------------------------

#### ***LB-Medium***

Trypton	1%
Hefe	0,5%
NaCl	1%
Agar	20g/l
pH	7,2

### ***Polyacryl-Gel***

DMSO (dimethylsulfozide)	92%
10x TBE-Puffer	1%
„long Ranger-Solution“ (Firma BMA)	0,85%
Urea	38 mg/ml
Polymerisation:	
APS (ammoium persulfat)10%	350 µl (6,5 *10 <sup>-3</sup> %)
TEMED 100%(tetramethyletylen diamin)	50 µl (9,2*10 <sup>-3</sup> %)

### ***Sequenzier-Reaktion, Zusammensetzung der Nukleotid-Reagenzien***

dATP-Reagenz	Tris-HCl (pH 9,5), MgCl <sub>2</sub> , Tween <sup>TM</sup> 20, Nonidet <sup>TM</sup> P-40, 2-mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddATP, Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
dCTP-Reagenz	Tris-HCl (pH 9,5), MgCl <sub>2</sub> , Tween <sup>TM</sup> 20, Nonidet <sup>TM</sup> P-40, 2-mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddCTP, Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
dGTP-Reagenz	Tris-HCl (pH 9,5), MgCl <sub>2</sub> , Tween <sup>TM</sup> 20, Nonidet <sup>TM</sup> P-40, 2-mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddGTP, Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase
dTTP-Reagenz	Tris-HCl (pH 9,5), MgCl <sub>2</sub> , Tween <sup>TM</sup> 20, Nonidet <sup>TM</sup> P-40, 2-mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, ddTTP, Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase

#### **4.2.2.2 Elektrophorese, Färbung, Darstellung im UV-Licht**

Zur Elektrophorese wurde ein 1,5%iges Agarosegel aus erhitzter Agarose und TAE-Puffer gegossen. Die Elektrophorese wurde nach dem Prinzip der Horizontal-Elektrophorese von Nukleinsäuren bei pH 8 durchgeführt. Die Färbung erfolgte im Ethidiumbromid-Bad für ca. 45 Minuten. Zur Darstellung und Protokollierung wurde die Fotografie unter einer UV-Lichtquelle gewählt.

#### **4.2.2.3 DNA Extraktion**

##### **4.2.2.3.1 DNA Extraktion aus EDTA-Blut**

Wie unter 4.1 erwähnt wurde von jedem Patienten 5 ml EDTA Blut erhalten. Aus diesem Blut musste zunächst DNA extrahiert werden. Das Protokoll wurde aus der laboreigenen Routine übernommen. Bei der DNA Extraktion wurde DNA aus den Leukozyten isoliert. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

**Lysis:** EDTA Blut wurde im Verhältnis 1:5 mit Lysis-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde ca. 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend zentrifugieren des Gemisches für 15 Minuten auf 4°C bei 1000 rpm. Nach Dekantieren des Überstandes und erneutem Versetzen mit Lysis-Puffer auf ca. 30 ml wiederum zentrifugieren für 15 Minuten. Wiederum Verwerfen des Überstandes. Über Nacht wurde das Sediment zusammen mit 8 Units Proteinase K und 5% SDS Puffer bei 55°C im Wasserbad inkubiert.

**Proteinfällung:** Die Reaktion wurde darauf mit 1,5 ml 5 molarer alkalischer NaCl Lösung versetzt um Proteine auszufällen. Nach Mischen mit Hilfe des Rüttlers und Zentrifugieren für 10 min bei 3500 rpm wurde der klare, die DNA enthaltende Überstand isoliert und das Sediment verworfen.

**DNA Isolierung:** Im Verhältnis 1:2 wurde dieser Überstand zum Ausfällen der DNA mit 96%igem Ethanol versetzt. Nachdem die so präzipitierte und isolierte DNA mit 70%igen Ethanol erneut gewaschen und dieser wiederum dekantiert worden war, wurde die DNA durch Verdunsten-lassen des Alkohols erneut isoliert. Die DNA wurde anschließend zur Lagerung in 500µl TE- Puffer gelöst.

#### 4. 2.2.3.2 Einstellung der DNA- Konzentration

Damit in der PCR konstante DNA-Mengen eingesetzt werden konnten, wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration der Doppelstrang DNA wurde mithilfe von UV-Absorptionsmessung gemessen. Diese Methode basiert auf der Absorption von Nukleinsäuren im kurzwelligen Spektralbereich bei 260nm (Nicholl, 1995). Es ergaben sich Werte zwischen 0.5µg/ml und 236.3µg/ml. Mittelwert: 65,11.

Anschließend wurde ein Aliquot der isolierten DNA auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese (70 V, 35 Minuten), Färbung mit Ethidiumbromid und Darstellung im UV-Licht die Konzentration beurteilt. Die Beurteilung erfolgte anhand des Vergleiches der sichtbaren Banden mit der Bande eines DNA-Gehalt Standards (115µg dsDNA/ml). Es fiel auf, dass speziell in den Sommermonaten, insbesondere bei längeren Transportzeiten, die DNA-Ausbeuten sehr gering waren.

#### 4.2.2.4 PCR

Um das Exon2 des Connexin26 Genes zu amplifizieren wurden zwei Primer benötigt, die außerhalb der Start- Sequenz und der Terminal- Sequenz des kodierenden Exons lagen. Es wurde die von Kelsell beschriebene Methode mit den dort veröffentlichten Primern gewählt (Kelsell et al., 1997).

**Abbildung 13:** Sequenzen der für PCR verwendeten Primer:

CX26r 5'TCTTTTCCAGAGCAAACCGC 3'
CX26f 5'CTGAGCACGGGTTGCCTCATC 3'

Abbildung 14 gibt Aufschluss über die Lage der PCR-Primer in der cDNA-Sequenz.

Abbildung 14: PCR-Primer in der cDNA des Connexin26 Genes (nach Lee,S.W. (Lee et al., 1992) und PubMed Nucleotid Query, Accession M86849 )

LOCUS	CX26WT95.D	2312 bp	DNA		
BASE COUNT	638 a	470 c	522 g	682 t	
ORIGIN					

1 gattttaatcc tatgacaaac taagttgggt ctgtcttcac ctgttttggg gaggttgtgt

61 aagagttggg gtttgcctcag gaagagattt aagcatgctt gcttaccag actcagagaa

121 gtctccctgt tctgtcctag ctatgttcct gtgttggtgtg cattcg**tctt ttccagagca**

Primer CX26r (TCTT TTCCAGAGCA)

181 **aaccgc**ccag agtagaag**at g**gattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggggtgtgaac

AACCGC)

Start

241 aaacactcca ccagcattgg aaagatctgg ctcaccgtcc tcttcatttt tcgcattatg

301 atcctcgttg tggctgcaaa ggaggtgtgg ggagatgagc aggccgactt tgtctgcaac

361 accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctcccacatc

421 cggctatggg ccctgcagct gatcttcgtg tccagcccag cgctcctagt ggccatgcac

481 gtggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga

541 tttaaggaca tcgaggagat caaaaccag aaggtccgca tcgaaggctc cctgtggtgg

601 acctacacaa gcagcatctt cttccgggtc atcttcgaag ccgccttcat gtacgtcttc

661 tatgtcatgt acgacggctt ctccatgcag cggctggtga agtgcaacgc ctggccttgt

721 cccaacactg tggactgctt tgtgtcccgg cccacggaga agactgtctt tcacagtgtt

781 catgattgca gtgtctggaa tttgcatcct gctgaatgtc actgaattgt gttatttgct

841 aat**tag**atat tgttctggga agtcaaaaaa gccagtttaa cgcattgccc agttgttaga

Stop

901 ttaagaaata gacagcatga gagg**gatgag gcaaccctg ct**cagctgtc aaggctcagt

Primer CX26f (CTGAGC ACGGGTGCCTCAT)

961 cgccagcatt tcccaacaca aagattctga ccttaaattgc aaccatttga aaccctgtga

1021 ggcctcaggt gaaactccag atgccacaat gagctctgct cccctaaagc ctcaaaacaa

1081 aggcctaatt ctatgcctgt cttaattttc tttcacttaa gttagtcca ctgagacccc

1141 aggctgttag gggttattgg tgtaaggtac tttcatattt taaacagagg atatcggcat

1201 ttgtttcttt ctctgaggac aagagaaaaa agccagggtc cacagaggac acagagaagg

1261 tttgggtgtc ctctgggggt tctttttgcc aactttcccc acgttaaagg tgaacattgg

1321 ttcttttcatt tqctttqgaa qttttaatct ctaacaqtgq acaaagtac caqtgcctta



Die Primer (CX26r, CX26f) wurden bei der Firma MWG- Biotech GmbH bestellt. Das von Kelsell beschriebene Protokoll (Kelsell et al., 1997) funktionierte in unseren Händen nur unzureichend. Deswegen wurde die Annealing-temperature T aopt optimiert. Die Annealing-temperature T aopt wurde folgendermaßen errechnet:  $[\text{Annealing-temperatur}]^{\circ}\text{C} = (\text{Anzahl A in Primersequenz} + \text{Anzahl T in Primersequenz}) * 2 + (\text{Anzahl C in Primersequenz} + \text{Anzahl G in Primersequenz}) * 4] - 5$ ; ) (mündliche Information von Dr.rer.nat. Jörg Schickel) (siehe Abbildung 15) In mehreren Versuchen konnte die Annealing-temperature für die PCR auf 59 °C festgelegt werden.

**Abbildung 15:** Annealingtemperatur der PCR Primer

Primer	Annealing-temperature
Cx26r	55° C
Cx26f	63° C

Für die PCR Reaktion wurde TAQ-Polymerase der Firma QIAGEN verwendet (Cat. No. 201203, 5 units/µl). Um optimale Bedingungen für die durchgeführten PCRs zu erhalten wurde das PCR-Protokoll an das Protokoll der TAQ®-Polymerase angeglichen. Reaktionsvolumen waren 50 µl. Es wurden unterschiedliche PCR-Protokolle ausprobiert. Nach einer längeren Erprobungs- und Optimierungszeit konnte letztendlich folgendes Protokoll als Standard festgelegt werden:

**PCR-Reaktionsansatz, Reaktionsansatz 50 µl:**

Primer Cx26r	132.5 pmol
Primer Cx26f	132.5 pmol
dCTP, dGTP, dTTP, dATP	Je 180 pmol
TAQ®-Polymerase	1,5 units
5 µl 10x Puffer	

Die in den einzelnen Proben vorhandene DNA-Konzentration wurde anhand der Dicke der Banden in der Elektrophorese abgeschätzt. Es wurde eine Ausgangsmenge von ca. 80 ng von genomischer DNA pro Reaktionsansatz (50 µl) angestrebt (Carrasquillo et al., 1997). Im Allgemeinen entsprach dies einem Volumen von ca. 10 µl des 1:50 verdünnten DNA-templates.

Nach Vorversuchen wurde folgendes Standardprotokoll festgelegt:

1 x	Thermische Denaturierung	94°C	5 Minuten
35 x	Thermische Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	59°C	30 Sekunden
	Extension durch TAQ®-Polymerase	72°C	30 Sekunden
1x	Finale Synthese	72°C	10 Minuten

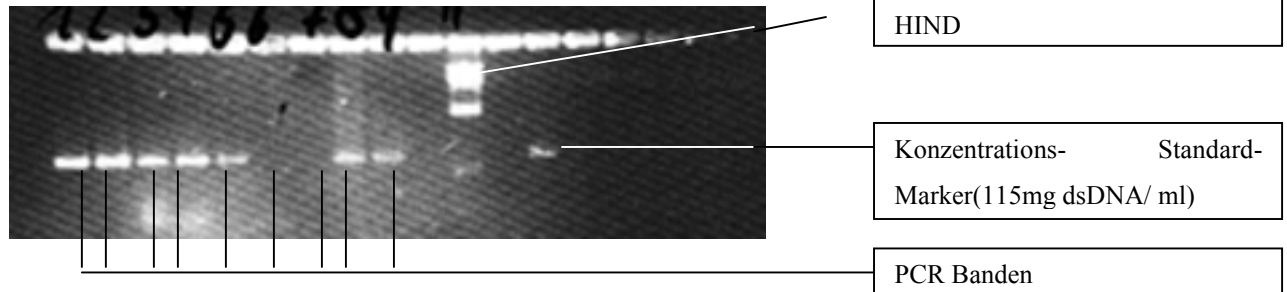
Alternativ wurde für DNA-Proben, bei denen die PCR in mehreren Versuchen nicht gelang, eine „touch-down“ oder „Hotstart“ Modifikation der PCR durchgeführt. Das Protokoll der Hotstart-PCR entsprach dem oben aufgeführten, nur wurde die Polymerase nach der thermischen Denaturierung zugefügt, das Protokoll der touch-down PCR war wie folgt:

1 x	Thermische Denaturierung	94°C	5 Minuten
5 x	Thermische Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	59,5°C	30 Sekunden
	Extension durch TAQ®-Polymerase	72°C	30 Sekunden
10 x	Thermische Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	58°C	30 Sekunden
	Extension durch TAQ®-Polymerase	72°C	38 Sekunden
15 x	Thermische Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	57°C	30 Sekunden
	Extension durch TAQ®-Polymerase	72°C	45 Sekunden
1 x	Finale Synthese	72°C	5 Minuten

#### 4.2.2.4.1 Kontrolle der PCR

Ein Aliquot der PCR- Proben wurden nach einer horizontalen Elektrophorese (70V, 25 Minuten) und Anfärbung unter UV-Licht dargestellt. Da das amplifizierte Fragment eine Länge von 778 bp erwarten lies, wurde als Standard- Marker  $\lambda$  III- HIND verwendet. Dieser geschnittene Phage deckt aufgrund seiner Fragmentlängen einen Bereich von 23.1 kb bis 550 bp ab. Um das richtige Fragment zu erkennen musste das Fragment auf der anionischen Seite des Fragmentes mit der Länge von 550bp gefunden werden (Siehe Abbildung 16).

**Abbildung 16** PCR-Kontrolle



#### 4.2.2.4.2 Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR-Produkte wurden gereinigt (Entfernung von Salzen und RNA- Fragmenten). Dazu wurde der Qiaquick PCR Purification-Kit der Firma QIAGEN benutzt. Zunächst wurde die Reinigung anhand des mitgelieferten Handbuchs durchgeführt.

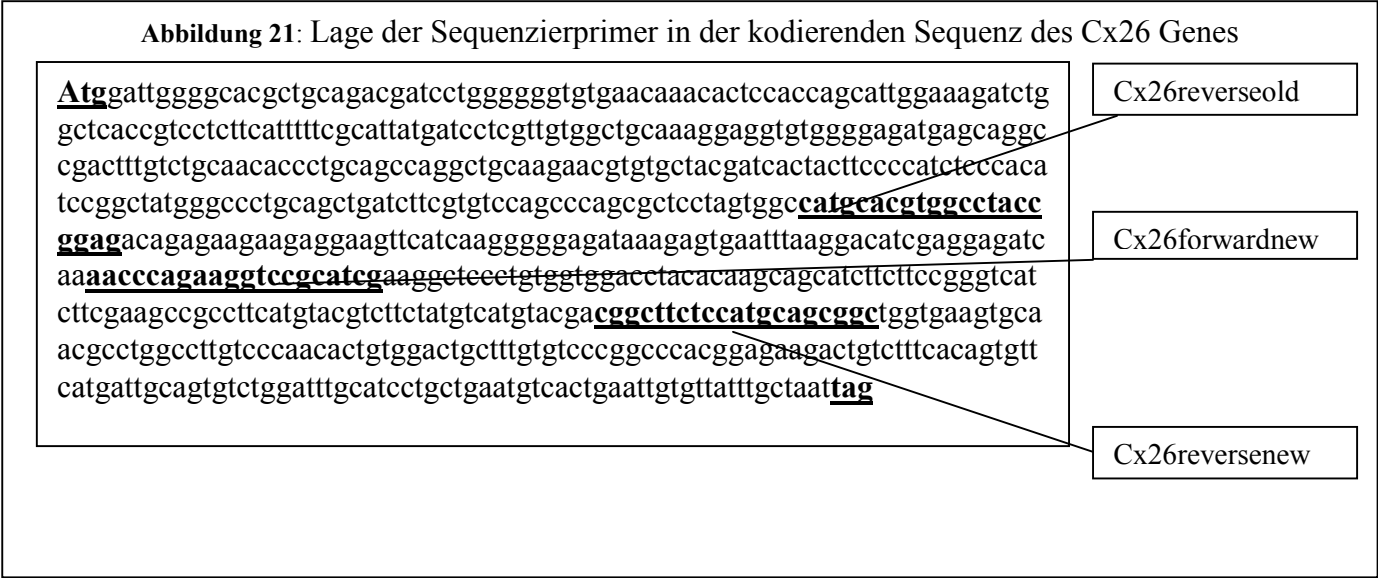
#### 4.2.2.5 Sequenzierung

Die aufgereinigten PCR- Produkte wurden zur Sequenzierung verwendet. Für die Sequenzierung des Exon2 wurde insgesamt mit drei Primern gearbeitet. Zu Beginn wurde mit den von Carasquillo et al übernommenen Primern gearbeitet (Carrasquillo et al., 1997). Die Lesbarkeit der Sequenzen war jedoch mangelhaft. In unserem daraufhin modifizierten Sequenzierprotokoll wurde der Primer „revold“ aus dem Protokoll von Carasquillo übernommen. Der von Carasquillo übernommene Sequenzierprimer forold wurde verworfen. Da ferner die Lesbarkeit der Sequenz sich im Bereich oberhalb von ca. 250 bp deutlich verschlechterte, wurden bei einer Länge des zu sequenzierenden Bereiches von 648 bp noch zwei zusätzliche Primer konstruiert (revnew, fornew). Die Originalsequenzen sind im Anhang dargestellt ( Anhang Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19). Alle Sequenzierprimer wurden bei der Firma MWG-Biotech hergestellt.

**Abbildung 20:** Sequenzen der Sequenzierprimer

```
CX26revold 5'CTCCGGTAGGCCACGTGCATG 3'
CX26revnew 5'GCCGCTGCATGGAGAAGCCG 3'
CX26fornew 5'AACCCAGAAGGTCCGCATCG 3'
```

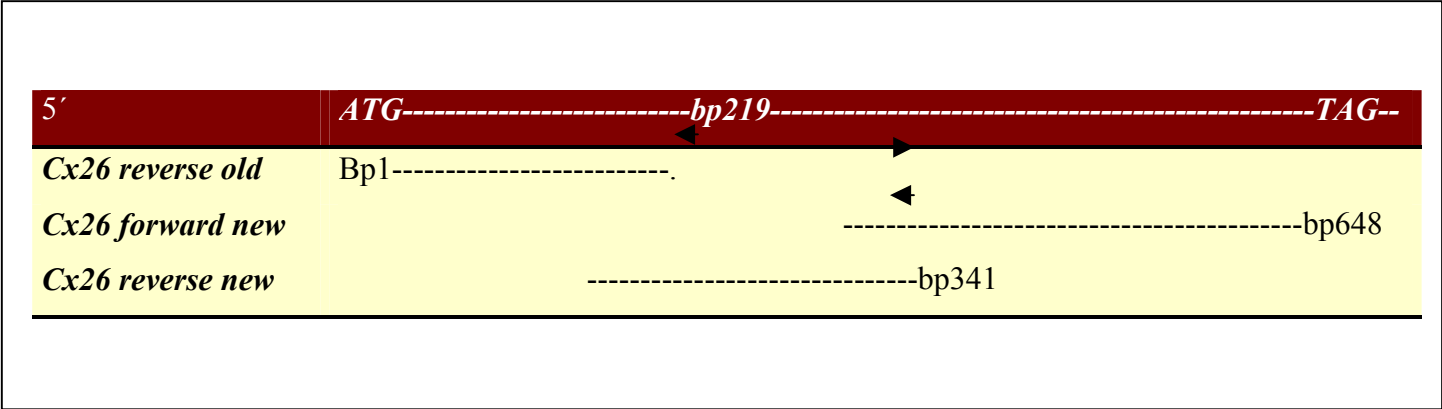
Abbildung 21 gibt Aufschluss über Lage der einzelnen Sequenzierprimer im kodierenden Exon des Connexin26 Genes.



Die Annealing-temperaturen ergaben sich zunächst aus den mitgelieferten Protokollen der Firma MWG-Biotech. Eine geringfügige Erhöhung der Annealing-temperatures lieferte besser lesbare Sequenzen.

**Abbildung 22:** Annealing-temperatures der Sequenzierprimer

Primer	Annealing-temperature
Cx26 reverse old	61° C
Cx26 forward new	63° C
Cx26 reverse new	61° C



Die Sequenzierung wurde mit nach der Dideoxy-Abbruch-Methode durchgeführt. Es wurden Sequenzierapparaturen der Firma LICOR (Vertrieb durch MWG Biotech) verwendet. Bei der verwendeten Sequenzier-Methode waren die Sequenzierprimer mit dem Farbstoff „ird 800“ für die Wellenlänge  $\lambda = 800 \text{ nm}$  markiert. Ein Laser konnte die durchtretenden Primer aufgrund des remittierten Lichtes erkennen. Die Primer wurden unter lichtarmen Bedingungen in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und auf eine Ausgangskonzentration von  $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  gebracht. Zur Sequenzierung wurde der „thermo Sequenase fluoescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (RPN 2438/ 2538) der Firma amersham pharmacia biotech verwendet. Der Kit enthält vier Reaktionsansätze mit je einem Nukleotid im Überschuss. Diese wurden gemäß des mitgelieferten Protokolls angewendet.

#### Reaktionsansatz der Sequenzier-Reaktion (25 $\mu\text{l}$ ):

Substrat	Konzentration
Primer (Cxrevold oder Cxrevnew oder Cxfornew)	0,01 pmol / (=1 $\mu\text{l}$ )
DNA-template	Ca. 30 ng / 6 $\mu\text{l}$
DMSO	25%
dATP-Reagenz oder dCTP-Reagenz oder dGTP-Reagenz oder dTTP-Reagenz	2 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	

Da die Primer unterschiedliche Annealing-Temperaturen besaßen, (siehe Abbildung 22) wurden die einzelnen Sequenzier-Reaktionen nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Dazu wurden folgende Programme gewählt:

#### Sequenzier-Reaktion:

1 x	Thermische Denaturierung	94°C	5 Minuten
32 x	Thermische Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	61/63°C	45 Sekunden
	Extension durch „Sequenase“	72°C	30 Sekunden
1 x	Finale Synthese durch Sequenase	72°C	5 Minuten

Sofort nach Abschluss der Reaktion wurde farbige Stopplösung (bestehend aus Formamid, EDTA und Fuchsin; im Sequenzier-Kit enthalten) hinzugegeben, um keine überflüssige Synthese entstehen zu lassen.

Ein Polyacrylgel wurde für ein Licor-spezifische Format gegossen. Jede einzelne Reaktion wurde in eine separate Tasche gefüllt. Im Anhang sind die so entstandenen Sequenzen dargestellt (siehe Anhang Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19).

#### **4.2.2.5.1 Auswertung der Sequenzen**

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe der Software „BaseimageIR“ (Licor). Nach der Erkennung der Sequenz durch die Software und einer anschließenden visuellen Überprüfung und Korrektur wurden die Sequenzen mit den Sequenzen der cDNA (Lee et al., 1992) verglichen. Die Sequenzen der einzelnen Primer wurden für jeden Patienten zusammengesetzt und überlappende Sequenzen überprüft (Siehe Anhang Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19). Auf diese Art konnte das gesamte Exon 2 auf Mutationen lückenlos überprüft werden.

#### **4.2.2.6 Klonierung von unbekannten heterozygoten Mutationen**

In Fällen, in denen eine heterozygote Mutation vorlag, wurden die beiden Allele kloniert. Dies wurde nur in Fällen durchgeführt, in denen die vermutete Mutation in der Literatur noch nicht zuvor beschrieben worden war, um die Mutation genau zu identifizieren.

Dazu wurde zunächst eine PCR des Connexin26 Genes des betroffenen Patienten durchgeführt.

**Ligation:** Als Vektor wurde PUC 18 verwendet. PUC 18 war zuvor durch Endonuklease SmaI blunt end geschnitten worden. In der Ligation wurden 100ng des SmaI- geschnittenen PUC 18 Vektor zusammen mit 150ng des gereinigten PCR- Produktes und T4- Ligase (3 units) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

**Transformation:** Herstellung kompetenter Zellen: Der Bakterienstamm E.Coli SMH 50 wurde ebenfalls über Nacht bei 37° C angezüchtet. Isolation der Bakterien erfolgte durch mehrmaliges Abkühlen, Zentrifugieren und Versetzen mit 50mmolarem CaCl<sub>2</sub>.

**Transformationsreaktion:** Nach der Isolierung der Bakterien wurden diese im Verhältnis 20:1 mit der Ligationreaktion versetzt (200µl Zellen: 10µl Ligationreaktion). Hitzeschock der Reaktion erfolgte für 1 Minute bei 42°C nach 30 Minuten auf Eis. Zur Transformation wurden die Zellen mit LB Medium(10:1), 2% Glucose und 10µg Thiamin versetzt und 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

**Anzüchtung:** Die transformierten Bakterien wurden nun auf zuvor gegossenen LB- Medium Platten, welche mit Ampicillin versetzt worden waren und als Indikatorsubstanzen mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) und x- Gal ( 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) (Nicholl, 1995) beimpft worden waren, angezüchtet. Die Anzüchtung erfolgte während 14 Stunden bei 37° C.

**Picken der Klone:** Aufgrund der Eigenschaften des Vektors PUC 18 (Ampicillin- Resistenz (APR)), Lactase (lacZ) konnten die das Insert (PCR-Produkt) enthaltenden Bakterien anhand des Ausbleibens der Färbung nach Spaltung von X-gal durch die durch das Insert nicht mehr funktionsfähige β-Lactase in 5,5- Dibrom-4,4'-Dichlorindigo (Nicholl, 1995) festgestellt werden (Prinzip der Insertionsinaktivierung). Diese Klone wurden mit einem sterilen Draht selektiert und in LB-Medium und Ampicillin über nacht bei 37°C angezüchtet. Danach erfolgte die Aufarbeitung der DNA der transformierten Klone.

**DNA-Isolierung aus kompetenten Zellen:** Aus kompetenten Zellen (Bakterien) wurde die DNA durch Lyse und Zentrifugieren eluiert. Dazu wurde der Silica-Spin-Kit-Manual der Firma QIAGEN verwendet. Das Protokoll wurde aus dem zugehörigem Handbuch übernommen.

**Kontrolle des Erfolges der DNA- Isolierung:** Die so gewonnene DNA wurde analog der PCR mittels Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel dargestellt.

**Sequenzierung der klonierten DNA:** Bei der Sequenzierung wurden wie unter 4.2.2.5 beschrieben vorgegangen. Es wurde jeweils der für den Sequenz-Abschnitt interessanteste Primer verwendet (siehe Abbildung 21). Die Klonierung der DNA wurde sooft wiederholt, bis das mutierte Allel nachgewiesen werden konnte.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Häufigkeit von Mutationen

#### 5.1.1 Kontrollen

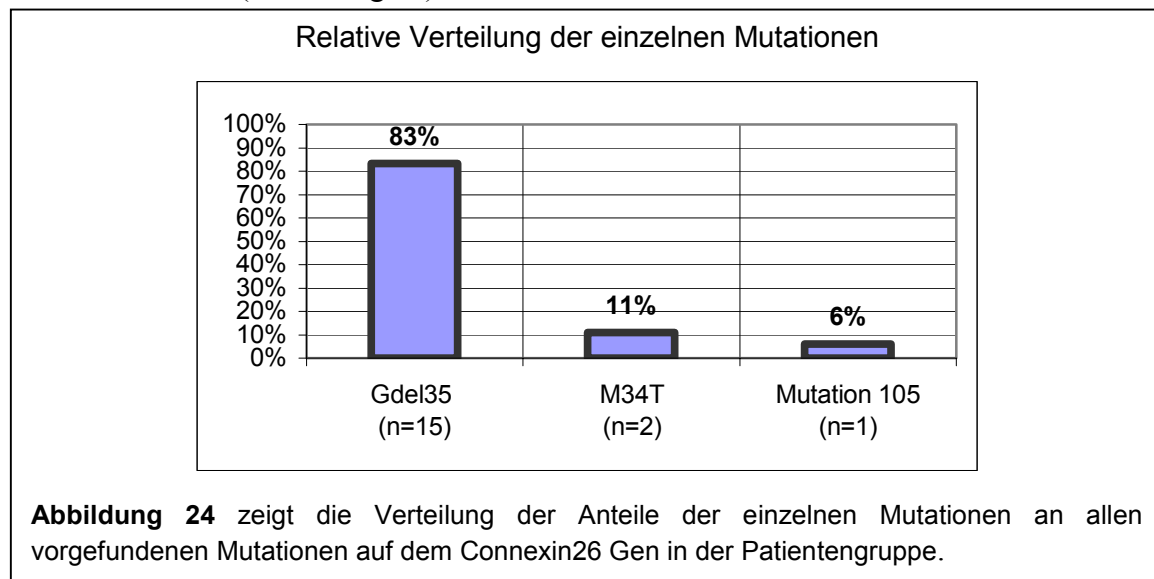
In keiner der Kontrollpersonen (n=10) konnte eine Mutation auf der kodierenden Sequenz festgestellt werden.

#### 5.1.2 Häufigkeit von Mutationen bei nicht miteinander verwandten Patienten

Die epidemiologischen Ergebnisse wurden auf Basis der Patientengruppe 2 (siehe 4.1.5) erhoben.

##### 5.1.2.1 Allelverteilung

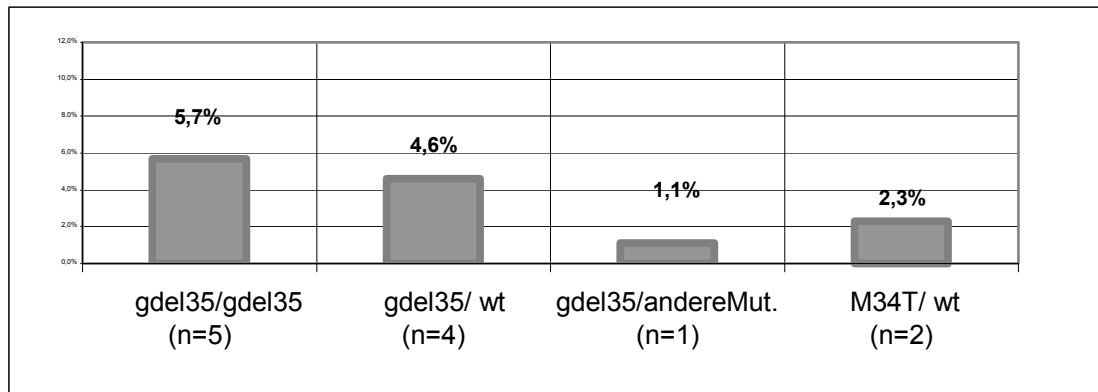
Insgesamt wurden 87 unabhängige – d.h. nicht verwandte - Patienten untersucht. Auf den entsprechenden 174 unabhängigen Chromosomen wurden Mutationen in 10,3% der sequenzierten Allele (Connexin26, Exon2) nachgewiesen. Der Großteil entfiel auf die Mutation Gdel35 (Abbildung 24).





### 5.1.2.2 Häufigkeit von Genotypen

**Abbildung 25: Verteilung der unterschiedlichen mutierten Genotypen in der Gruppe der unabhängigen Patienten**



Die Untersuchung der Genotypen ergab insgesamt bei 13,8 % der Patienten mindestens eine Mutation auf dem Connexin26 Gen, Exon2. Bei 11,5 % der Patienten konnte mindestens eine Gdel35 gefunden werden, dies entspricht 83 % aller Patienten mit einer Mutation auf dem Connexin26 Gen, Exon2.

Abbildung 25 zeigt die Verteilung der unterschiedlichen Genotypen bei nicht verwandten Patienten. Der Genotyp mit einer homozygoten Gdel35 Mutation war, wenn überhaupt Mutationen gefunden wurden am häufigsten, nur selten fand sich dabei ein Genotyp, der keine Gdel35 aufweist (2,3%)

Einen autosomal rezessiven Erbgang des DFNB1 Locus vorausgesetzt, konnte der Genotyp somit bei 6,9% der schwerhörigen Patienten komplett aufgeklärt werden. Der Anteil der Patienten, bei denen (im Falle eines autosomal rezessiven Erbganges wie er für alle vorgefundenen Mutationen postuliert wird) der Genotyp durch Sequenzierung des Exon2 des Connexin26 Genes nur inkomplett aufgeklärt werden konnte, beträgt ebenfalls 6,9%.

Im Überblick sind diese Zahlen nochmals in Tabelle 13 dargestellt:

Homozygote Genotypen	Compound heterozygote Genotypen	Heterozygote Genotypen
5,7 % (n= 5)	1,1 % (n= 1)	6,9 % (n=6)

**Tabelle 13:** Häufigkeiten der mutierten Cx26-Genotypen

Deswegen ergab sich folgendes Ergebnis zur Aufklärung von Genotypen (Tabelle 14):

<b>Genotyp komplett aufgeklärt</b>	6,9 %
<b>Genotyp inkomplett aufgeklärt</b>	6,9 %
<b>Genotyp nicht aufgeklärt</b>	86 %

**Tabelle 14:** Aufklärung von Genotypen durch Sequenzierung von Exon2

In Tabelle 14 wurde von einem rezessiven Erbgang aller vorgefundenen Mutationen ausgegangen. Die Mutation M34T wird von einigen Autoren auch als autosomal dominant beschrieben (siehe Diskussion). Eine genaue Abschätzung der Natur dieser Mutation ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, daher enthalten diese Angaben zur Häufigkeit vollständig aufgeklärter Genotypen eine kleine Unsicherheit.

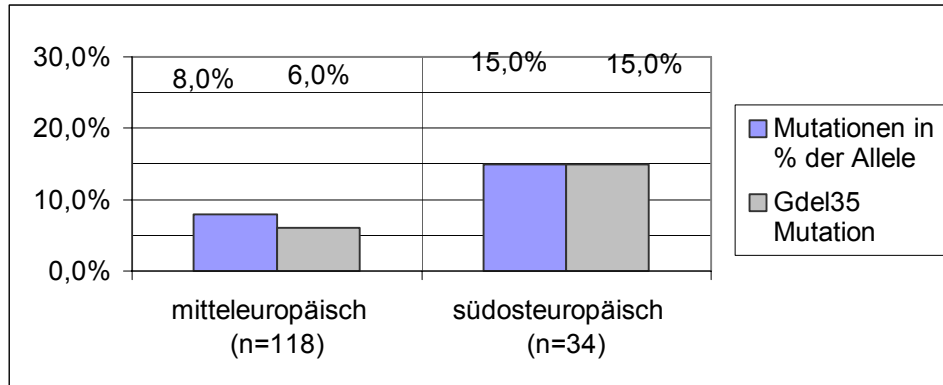
### **5.1.3 Patientenuntergruppen**

#### **5.1.3.1 Unterschiedliche geographische Herkunft**

Für die unter 4.1.6 beschriebenen Untergruppen konnten folgende Unterschiede gefunden werden.

In der Gruppe der südosteuropäischen Patienten (34 Allele) war die Allelverteilung zugunsten von Mutationen verschoben. In dieser Gruppe wurde nur die Gdel35 Mutation gefunden, während sie bei den mitteleuropäischen Fällen nur 70% aller gefundenen Mutationen ausmachte (Abbildung 26).

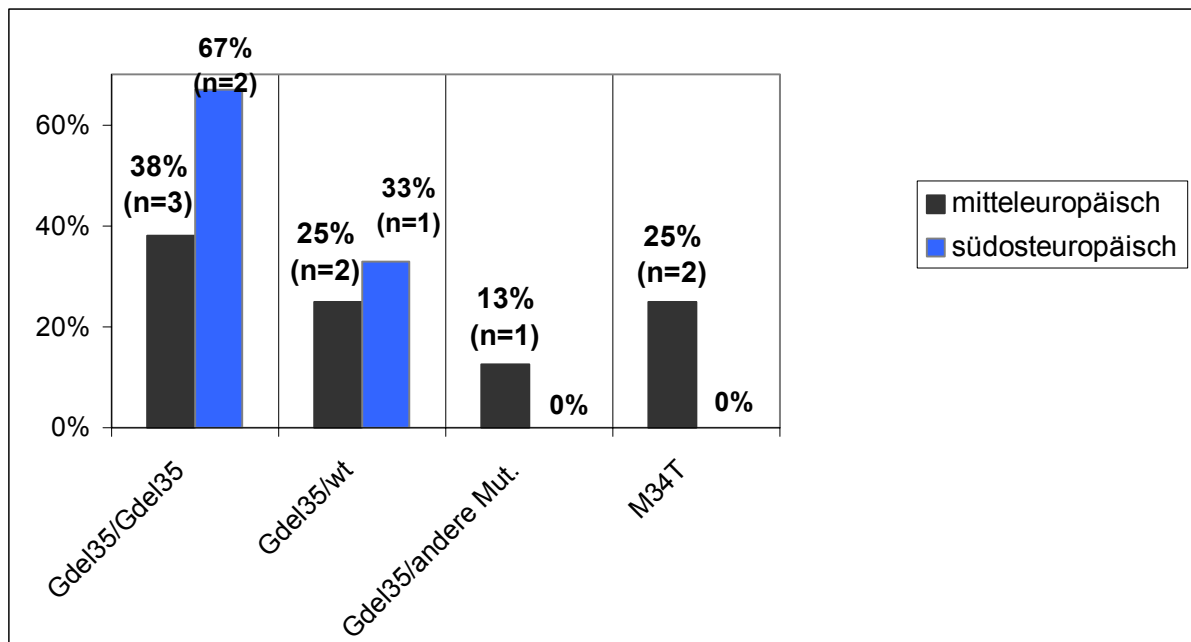
**Abbildung 26: Mutationen im Cx26 Gen mittel –und südosteuropäischer Patienten (Allelverteilung)**



Eine weitere Differenzierung nach einzelnen Ländern ist aufgrund der zum Teil sehr geringen Fallzahlen nicht sinnvoll.

In der Gruppe der südosteuropäischen Patienten konnte der Gdel35 homozygoter Genotyp am häufigsten und im Gegensatz zur mitteleuropäischen Gruppe konnte keine andere Mutation nachgewiesen werden (Abbildung 2/).

**Abbildung 27: Anteil der Genotypen an allen nachgewiesenen Mutationen in Patientengruppen unterschiedlicher geographischer Herkunft.**



### 5.1.3.2 Ausmaß der Schwerhörigkeit

Anhand der Einteilung des Ausmaßes der Schwerhörigkeit (Tabelle 15, siehe auch 4.1.6.2) ließ sich feststellen, dass in der Gruppe mit höhergradiger Schwerhörigkeit häufiger ein mutiertes Allel nachgewiesen werden konnte und dass in dieser Gruppe, im Vergleich zu den beiden anderen, wesentlich mehr Patienten eine Mutation auf beiden Allelen aufwiesen.

Gruppenbezeichnung	Ausmaß der Schwerhörigkeit
Gruppe 1	Hochgradig oder Hörrestigkeit
Gruppe 2	Mittelgradig oder mittel- bis hochgradig
Gruppe 3	Geringgradig oder gering- bis mittelgradig

**Tabelle 15** : verwendete Einteilung der unterschiedlichen Schwerhörigkeitsgrade.

Abbildung 28 zeigt die Häufigkeiten von mutierten Allelen in den Gruppen mit unterschiedlichen Schweregraden der Schwerhörigkeit. Die Einteilung in die einzelnen Gruppen wurde unter 4.1.6.2 beschrieben (siehe Tabelle 15). Mutationen auf dem Connexin26 Gen kommen in der Gruppe mit höhergradiger Schwerhörigkeit insgesamt häufiger vor. Die Gdel35 findet sich in dieser Gruppe wesentlich häufiger als in den Gruppen mit geringerem Schwerhörigkeitsausmaß.

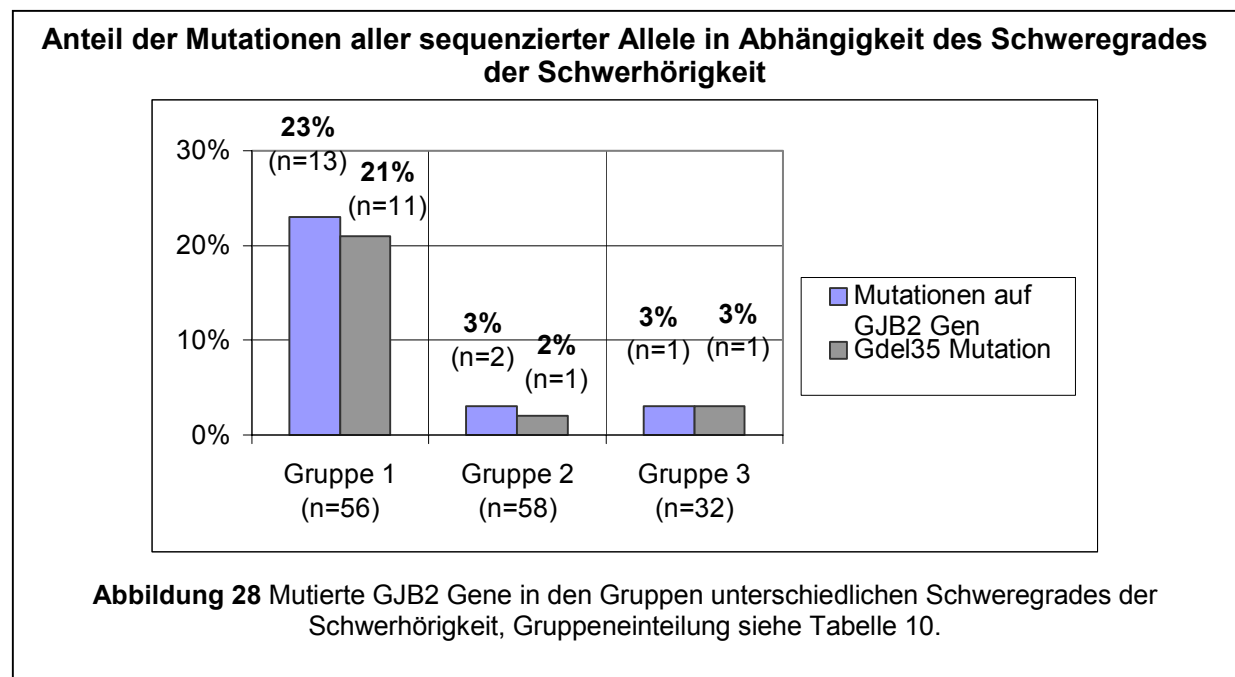
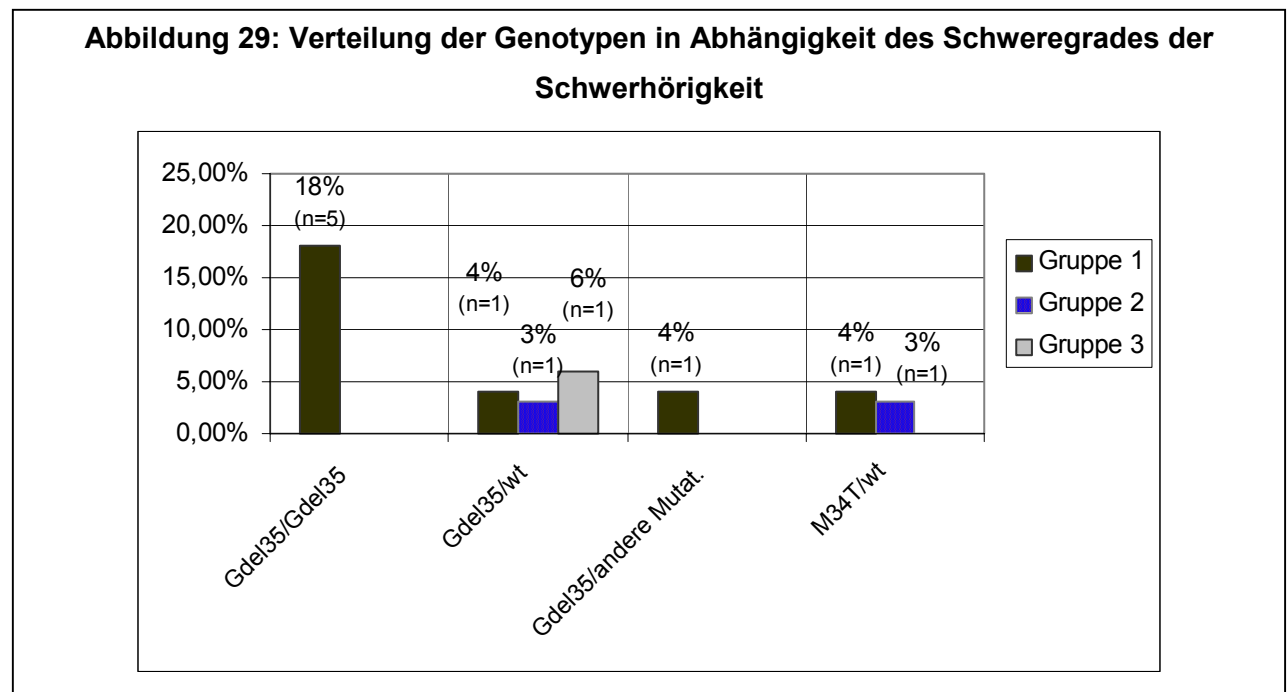


Abbildung 29 stellt die entsprechende Verteilung der Genotypen in den einzelnen Gruppen dar. Von den Patienten, die mindestens eine mittelgradige Schwerhörigkeit aufwiesen, konnte in 13% eine Gdel35 Mutation nachgewiesen werden.



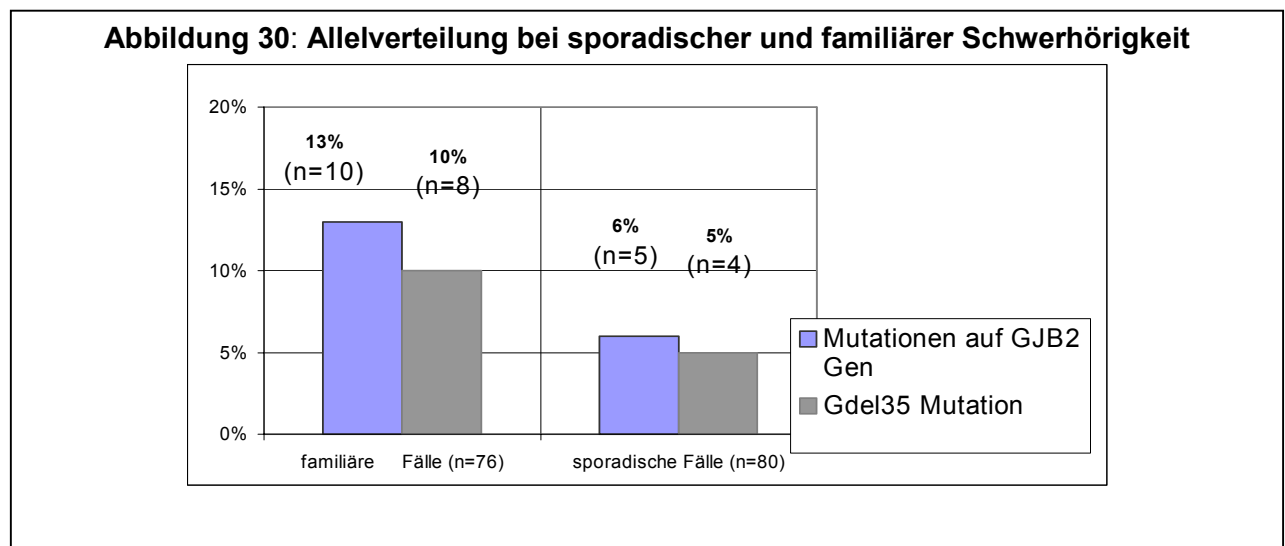
### 5.1.3.3 Familienanamnese (sporadische / familiäre Fälle)

Die in ihrer Familienanamnese dokumentierten Fälle wurden in zwei Gruppen eingeteilt (Tabelle 16).

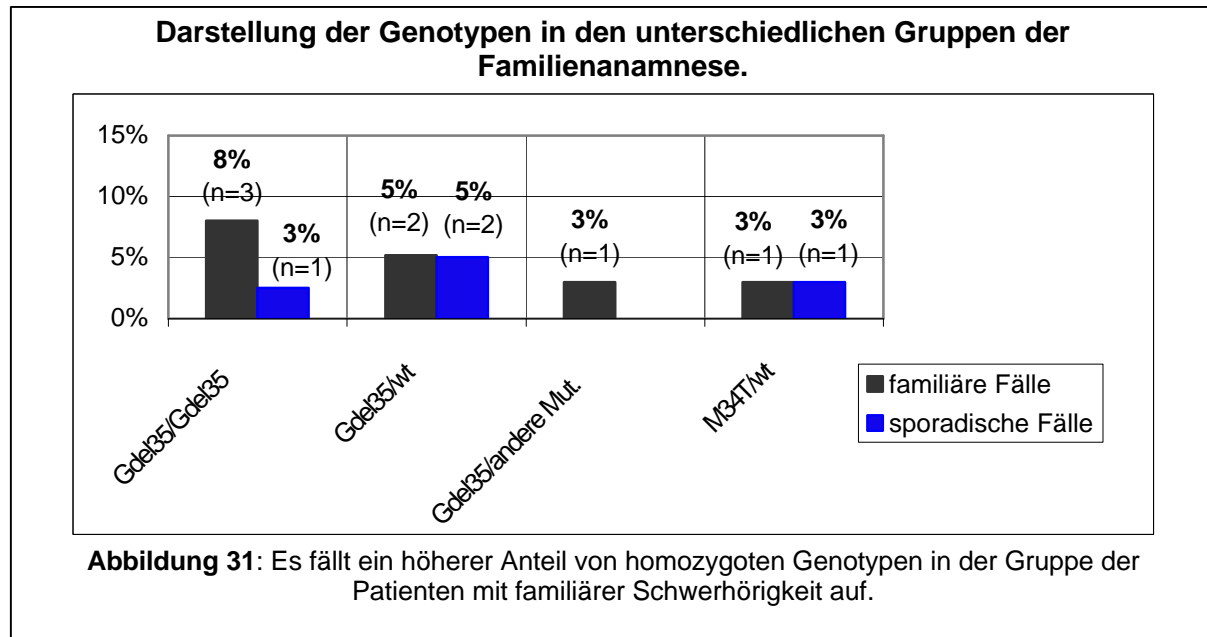
<b>Sporadische Fälle</b>	In der Familienanamnese ist in den vorhergehenden zwei Generationen kein Fall von idiopathischer Schwerhörigkeit bekannt. Ausgenommen wurde Presbyakusis.
<b>Familiäre Fälle</b>	Vorliegen eines Falles von idiopathischer Schwerhörigkeit innerhalb der letzten zwei Generationen.

**Tabelle 16:** Definition der sporadischen und familiären Fällen.

Abbildung 30 zeigt bei annähernd gleichen Fallzahlen (familiäre Fälle 76 Allele, sporadische Fälle 80 Allele) eine höhere Prävalenz von mutierten Allelen in der Gruppe familiärer Fälle.



Aus Abbildung 31 ist ersichtlich, dass in der Gruppe der familiäre Fälle deutlich mehr (8%) Patienten vorkommen, die einen homozygoten Genotyp für die Gdel35 Mutation aufweisen. Betrachtet man die Patienten, die in dieser Gruppe biallelische Mutationen besaßen (Gdel35/Gdel35 oder Gdel35/ andere Mutationen), ist der Unterschied zwischen der Gruppe mit familiärer Schwerhörigkeit (11%) und sporadischer Schwerhörigkeit (3%) noch deutlicher.





## 5.2 Betrachtung der einzelnen Mutationen

### 5.2.1 Gdel35

#### 5.2.1.1 Prävalenz von Gdel35 in der gesamten Patientengruppe

Insgesamt wurde bei 87 (174 Allele) Patienten das Exon2 auf eine Gdel35 Mutation untersucht. 8,6 % aller Allele der Patienten zeigten eine Gdel35 Mutation auf dem Exon2 des Connexin26 Genes mit der folgenden Genotyp Verteilung (Tabelle 17):

	Biallelische Mutationen auf dem Connexin26 Gen		Monoallelische Gdel35 Mutation
	Homozygote Gdel35 Mutation	Sicher compound heterozygote Gdel35	Heterozygote Gdel35 Mutation *
Prozent aller Gdel35 Mutation betroffener Patienten	50%	10%	40%

**Tabelle 17: Prävalenzen von Gdel35**

Biallelische bedeutet, dass Mutationen auf beiden Allelen des CX26 Genes nachgewiesen werden konnten; wenn nur auf einem Allel eine Mutation gefunden wurde, ist zwischen Heterozygotie und compound Heterozygotie nicht sicher zu unterscheiden.

Bei den Patienten, bei denen die Gdel35 auf nur einem Gen nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um einen heterozygoten Genotyp. Ein heterozygoter Genotyp für die Mutation Gdel35 kann aber auch bei Personen nachgewiesen werden, die nicht phänotypisch auffällig sind. Demzufolge, handelt es sich um einen inkomplett aufgeklärten Genotyp. Möglichkeiten für die Unvollständigkeit der Aufklärung könnten begründet sein in:

- 1) einer Mutation auf dem Noncoding Exon1 des Connexin26 Genes des nicht betroffenen Exon2 des Connexin26 Genes. Mutationen in Exon1 wurden im Zusammenhang mit einem autosomal rezessiven Erbgang der M34T Mutation beschrieben. Nach gegenwärtigen Stand (07/02) sind diese Mutationen jedoch selten. (Houseman et al., 2001)
- 2) einer Mutation auf einem anderen Connexin-Gen, das in funktionellem Zusammenhang mit dem Connexin26 Gen steht. (z. B. Connexin32 (Denoyelle et al., 1999))

### 5.2.1.2 Prävalenz der Gdel35 Mutation in Patientengruppen unterschiedlicher geographischer Herkunft

Patienten mit einer gesicherten Herkunft aus dem deutschen Sprachraum (n=59), hatten nur in 6% der sequenzierten Allele eine Gdel35 Mutation. Lag eine Gdel35 Mutation vor, so kam sie in 50% zusammen mit einer weiteren Mutation (Gdel35 oder andere Mutation) auf dem zweiten Allel vor. Demgegenüber zeigte die Gruppe anderer Herkunft (n= 19), eine Gdel35-Allel-Frequenz von 13. 80% (4 von 5) der mutierten Allele lagen homozygot vor. In dieser Gruppe konnte außer der Gdel35 keine andere Mutation nachgewiesen werden.

Nach der oben dargelegten Definition von Gruppen unterschiedlicher Herkunft ergaben sich die in der Tabelle 18 gezeigten Verteilungen.

Die Mutation Gdel35 kam in der Gruppe der südosteuropäischen Patienten häufiger homozygot vor als in der Gruppe der mitteleuropäischen Patienten.

In der Gruppe der südosteuropäischen Patienten (n=17) konnten Gdel35 mutierte Allele in 15% der Allele gefunden werden. 80 % lagen dabei in homozygotem Zustand vor (4/5). Demgegenüber wurde in der mitteleuropäischen Patientengruppe eine Gdel35 in nur 8,5 % der sequenzierten Allele nachgewiesen werden.

	<b>Gdel35 Allel-Pävalenz</b>	<b>Anzahl sequenzierte r Allele</b>
<b>Gesicherte Abstammung aus dem deutschen Sprachraum</b>	8,5%	118 Allele
<b>Andere Herkunft</b>	13%	38 Allele

**Tabelle 18:** Anteil der mutierten Allele (Gdel35) mit gesicherter Abstammung aus dem deutschen Sprachraum

## 5.2.2 Beschreibung des Phänotyps bei Vorliegen der Gdel35 Mutation

In diesem Abschnitt soll die Schwerhörigkeit der von Gdel35 betroffenen Patienten betrachtet, auf den vorliegenden Genotyp (homozygot, compound heterozygot, heterozygot), der Lateralisation, den Grad der Schwerhörigkeit und die betroffene Frequenzen eingegangen werden. Um höhere Zahlen und somit verlässlichere Werte zu erlangen, werden hier alle von einer Mutation betroffenen Patienten herangezogen (Patientengruppe 1, siehe 4.1.5).

### 5.2.2.1 Asymmetrie

Alle Patienten, bei denen mindestens ein Allel des Connexin26 Genes von einer Gdel35 Mutation betroffen war, litten an einer beidseitigen Schwerhörigkeit. (Grad 0 der Asymmetrie, siehe 4.1.6.4)

### 5.2.2.2 Schwerhörigkeitsgrad

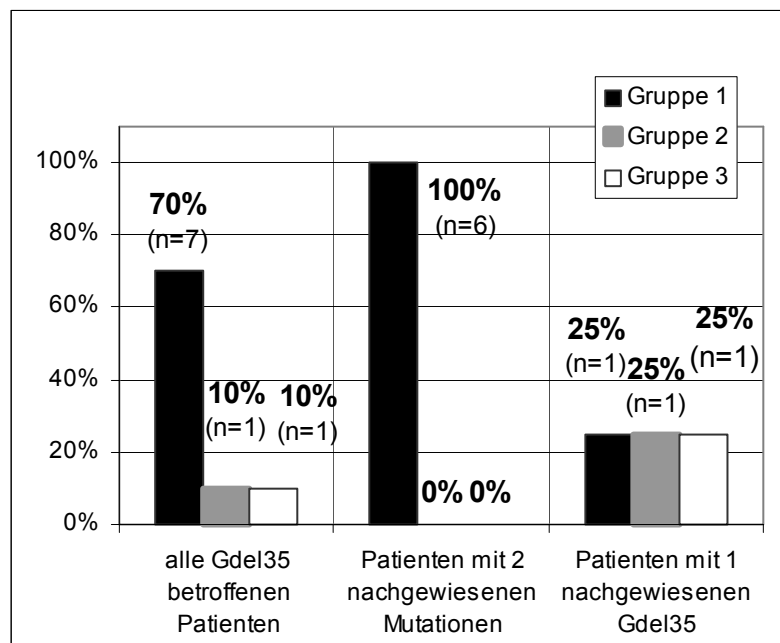
Die meisten (70%) der von einer Gdel35 betroffenen Patienten zeigten eine mindestens hochgradige Schwerhörigkeit und entfielen somit auf Gruppe 1 der oben dargestellten Einteilung nach Schweregrad (siehe 4.1.6.2). Tabelle 19 zeigt die Verteilung der unterschiedlichen Schwerhörigkeitsgrade in der Gruppe der Gdel35 Betroffenen.

Schwerhörigkeitsausmaß	Prozent der Patienten mit mindestens einer Gdel35-Mutation auf dem Cx26 Gen (n=10, *1 Fall nicht dokumentiert)
Gruppe 1 (n=28)	70% (n=7)
Gruppe 2 (n=29)	10% (n=1)
Gruppe 3 (n=16)	10% (n=1)

**Tabelle 19:** Prozentuale Anteile der Allele mit einer Gdel35 Mutation in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schwerhörigkeit (Einteilung siehe 4.1.6.2, Tabelle 10 )

Es zeigte sich, dass die meisten Patienten, die eine Gdel35 Mutation aufwiesen, in der Regel an einer höhergradigen Schwerhörigkeit litten. Berücksichtigte man den Genotyp der Mutation, ließ sich feststellen, dass alle Patienten, bei denen zwei mutierte Allele des Connexin26 Genes gefunden werden konnten, eine mindestens hochgradige Schwerhörigkeit hatten (siehe Abbildung 32).

### Häufigkeit von Cx26-Genotypen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schwerhörigkeit



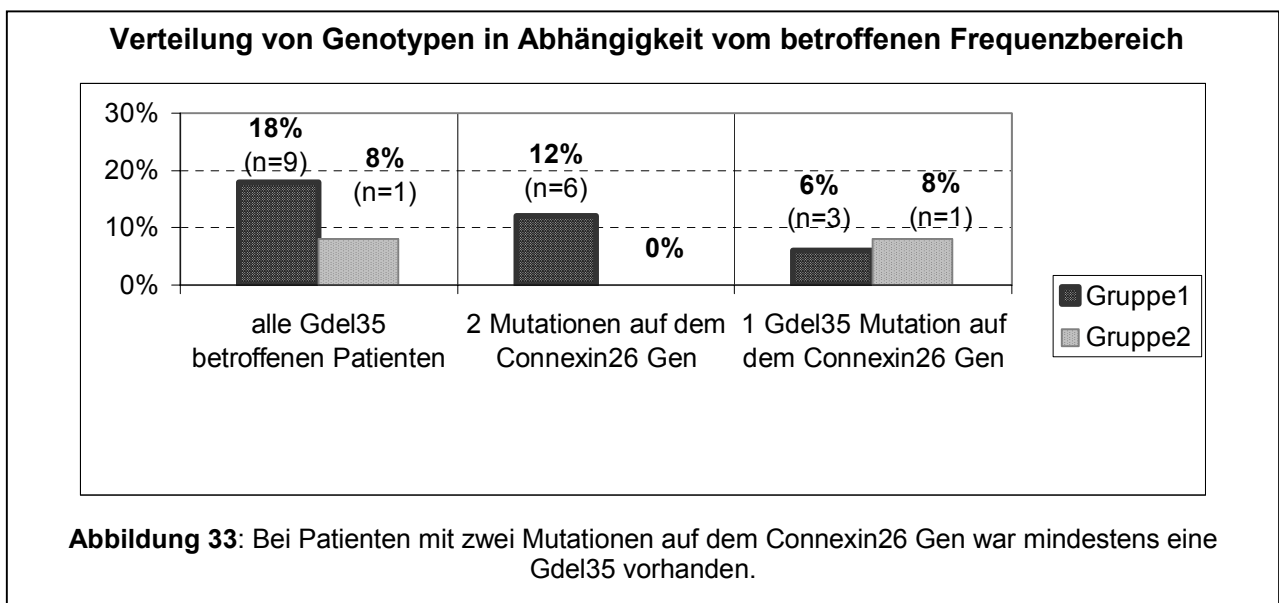
**Abbildung 32:** Bei den Patienten mit zwei erwiesenen Mutationen liegt entweder der Genotyp Gdel35/Gdel35 oder Gdel35/andere Mutation vor (Einteilung der Gruppen siehe Tabelle 10, 4.1.6.2.).

### 5.2.2.3 Betroffene Frequenzen

Um größere Fallzahlen zu erreichen, wurden die Patienten, abweichend von der Einteilung in 4.1.6.3 zu den in Tabelle 20 dargestellten Übergruppen zusammengefasst.

<b>Tabelle 20: Einteilung der Patienten in Gruppen nach betroffenen Frequenzen</b>		
	<b>Beschreibung</b>	<b>Anzahl Patienten insgesamt</b>
<b>Gruppe1</b>	Patienten, deren Schwerhörigkeit unter anderem die mediocochleären Frequenzen betrifft. (Ausfall betrifft pancochleäre, mediocochleäre, mediocochleäre-basocochleäre oder mediocochleäre-apikocochleäre Frequenzen)	50
<b>Gruppe2</b>	Mediocochleären Frequenzen nicht betroffen. (Ausfall betrifft apikocochleäre oder basocochleäre Frequenz)	12

Basierend auf dieser Einteilung ergaben sich die in Abbildung 33 dargestellten Verhältnisse.



In Gruppe 1 (mediocochleäre Frequenzen betroffen) fand man häufiger eine Gdel35 Mutation als in der Gruppe, in der die mediocochleären Frequenzen ausgespart waren (Gruppe 2). Waren beide Allele von einer Mutation betroffen (homozygote Gdel35 oder compound heterozygote Gdel35), betrafen diese in allen Fällen die mediocochleären Frequenzen.

### **5.2.3 Korrelation Phänotyp / Genotyp anhand der Audiogramme**

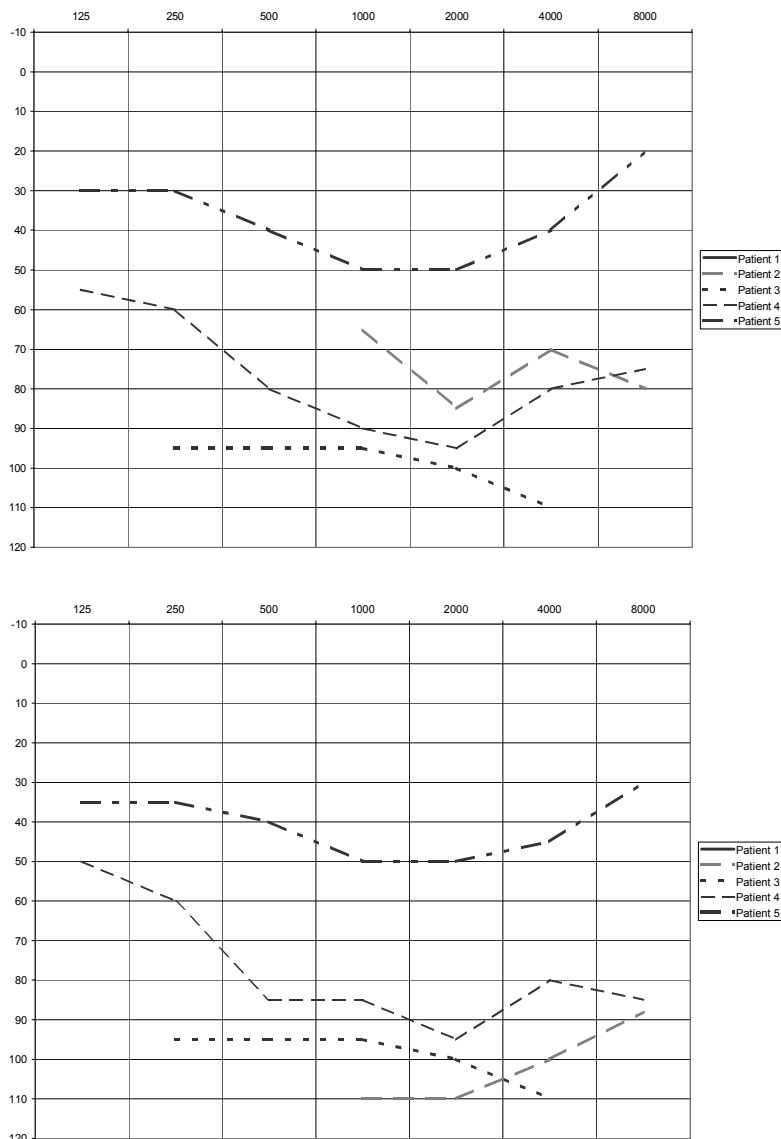
Im Folgenden sollen die Patienten in eine Gruppe homozygot (Gdel35/Gdel35) Betroffener, compound heterozygot betroffener (Gdel35/ andere Mutation auf CX26 Gen) und heterozygot (Gdel35/ WT) betroffener zusammengestellt werden. Die Gruppe der homozygoten und compound heterozygoten Patienten wird dabei als eine Gruppe zusammengefasst, bei welcher der Genotyp komplett aufgeklärt wurde.

#### **5.2.3.1 Komplette aufgeklärter Genotyp**

##### **5.2.3.1.1 Homozygotie Gdel35**

Insgesamt wurden 5 Patienten mit einer homozygoten Gdel35 auf dem Connexin26 Gen gefunden. Ein für die Sequenz-Veränderung typisches Bild zeigt Abbildung 34 im Anhang. Bei 3 (60%) der 5 Patienten lag eine familiäre Hörstörung vor. Bei den restlichen 2 Patienten fanden sich in der Familienanamnese keine Hinweise auf Schwerhörigkeit. Auffällige statomotorische Entwicklung wurde in keinem Fall dokumentiert. In der Gruppe der homozygot betroffenen Patienten waren beide Geschlechter vertreten. (Geschlechtsverteilung m:w 2:3) Drei (60 %) der homozygot betroffenen Patienten waren deutscher Herkunft, die zwei anderen stammten aus dem Gebiet der ehemaligen GUS Staaten, die entsprechenden Audiogramme für alle fünf Patienten sind in Abbildung 35 dargestellt.

### Audiogramme der Gdel35 homzygoten Patienten



**Abbildung 35:** Audiogramme (Reintonaudiometrie, Luftleitung) oben rechtes Ohr, unten linkes Ohr.

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Audiometrie lag bei 4 Jahren (Mittelwert) (Median 3 Jahre). Die ältesten Patienten waren bei der Untersuchung 6 Jahre (Patient 2 und 4) die zwei jüngsten je 3 Jahre alt (Patienten 1 und 3). Bei Patient 3 wurde eine Hirnstammaudiometrie vorgenommen. Deshalb ist in der Zusammenstellung der Audiogramme nur der Befund der Freifeldtonaudiometrie berücksichtigt. Die Auswertung der BERA Untersuchung ergab einen Schweregrad 1 (an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit) Im notched Noise Modus stellte sich eine nahezu seitengleiche pancochleäre Schwerhörigkeit dar. Bei Patient 2 konnte aufgrund des Alters und des Schweregrades der Schwerhörigkeit keine Tonaudiometrie durchgeführt werden. Bei ihm zeigte die frequenzspezifische Schwellenbestimmung im untersuchten Frequenzbereich (1000-8000 Hz) rechts um 70 bis 80 dB angehobene Schwellenwerte und links keine signifikanten Antworten.

**Betroffene Frequenzen:** Die mediocochleär vermittelten Frequenzen waren bei Gdel35-homozygoten Patienten am stärksten betroffen (siehe Abbildung 32). Im Vergleich mit den heterozygoten Individuen (siehe unten) fiel jedoch auf, dass die homozygoten Individuen wesentlich stärker beeinträchtigt sind (Dämpfung bei 2000 Hz zwischen 50 und 70 dB). Mit Ausnahme Patient 3 ist bei den Homozygoten der Hochtonbereich (basocochleär) weniger stark als der mediocochleäre Bereich geschädigt.

**Schweregrad der Schwerhörigkeit:** Alle Gdel35-homozygoten Patienten waren hochgradig schwerhörig (Einteilung siehe Tabelle 10). Eine Progredienz der Schwerhörigkeit konnte nicht dokumentiert werden.

#### **5.2.3.1.2 Compound Heterozygotie**

Die Bezeichnung „compound heterozygot“ besagt, dass beide Allele verschiedene Mutationen im selben Gen aufweisen. Von allen Patienten, die einen heterozygoten Genotyp für die Gdel35 besaßen (n=5), konnte in einem Fall (20%) ein compound heterozygoter Genotyp festgestellt werden. Die zweite Mutation, die diesen Genotyp ausmachte, war in diesem Fall die Mutation „105“ (314-327del(14)). Das Sequenzmuster einer Mutation 105 (nach Klonierung) zeigt Abbildung 36 im Anhang. Dieser Fall zeigte eine familiäre Hörstörung. Durch Untersuchung von Angehörigen konnte noch ein weiterer Fall festgestellt und untersucht werden. Um eine höhere Aussagekraft für den Phänotyp zu erreichen, wurde hier die audiologische Untersuchung des Halbbruders, der ebenfalls den Genotyp Gdel35 /105 besitzt, mitausgewertet.

Die pädaudiologische Diagnose für die vom Genotyp Gdel35/105 betroffenen Individuen (2) war durchweg hochgradig bis hörrestig. Bevorzugte Frequenzen ließen sich nicht erkennen. Bei beiden Patienten konnte keine Reintonaudiometrie vorgenommen werden.

Die BERA Untersuchung von Patient 1 ließ keine frequenzspezifischen Antworten erkennen, bei Patient 2 konnte in der Freifeldtonaudiometrie ebenfalls keine besonders betroffenen Frequenzen festgestellt werden. Die Audiogramme sind nicht aufgeführt.

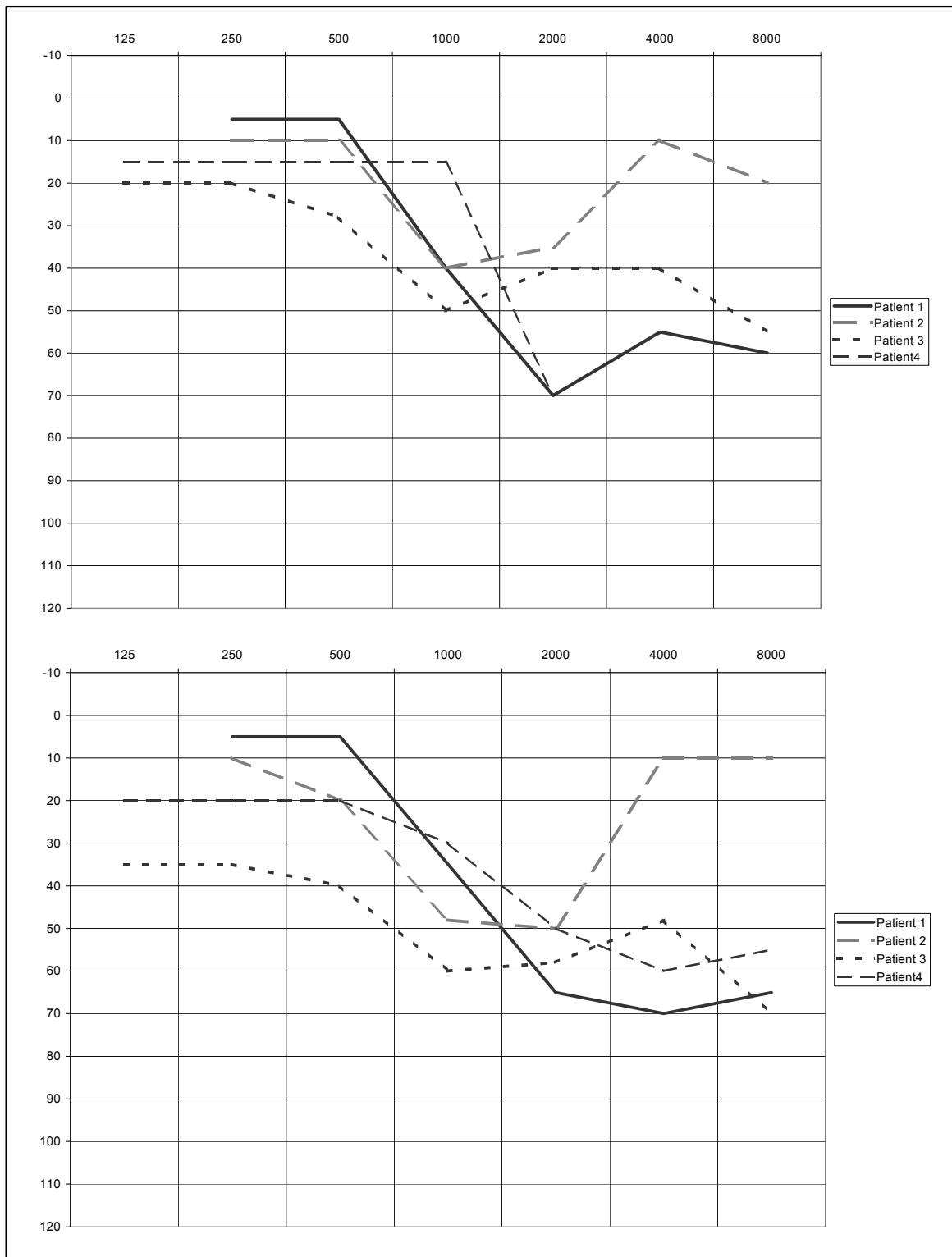


### **5.2.3.2 Mutationen nur auf einem Allel nachweisbar (monoallelisch)**

#### **5.2.3.2.1 Heterozygotie Gdel35**

Insgesamt wurden vier für Gdel35 heterozygote Patienten identifiziert. Ein für die Sequenzveränderung typisches Bild zeigt Abbildung 37 im Anhang. Nur in drei Fällen konnte die Familienanamnese erhoben werden, ein Kind war adoptiert. In zwei der drei dokumentierten Fällen lag eine sporadische Erkrankung vor. Die Geschlechterverteilung in der Gruppe der Gdel35 heterozygot betroffenen Patienten war ausgewogen (2:2). Die statomotorische Entwicklung verlief in allen vier Fällen unauffällig, eine Progredienz der Erkrankung war in keinem der Fälle bekannt. Die Audiogramme sind in Abbildung 38 dargestellt.

### Audiogramme aller Patienten mit monoallelischer (heterozygoter) Gdel35



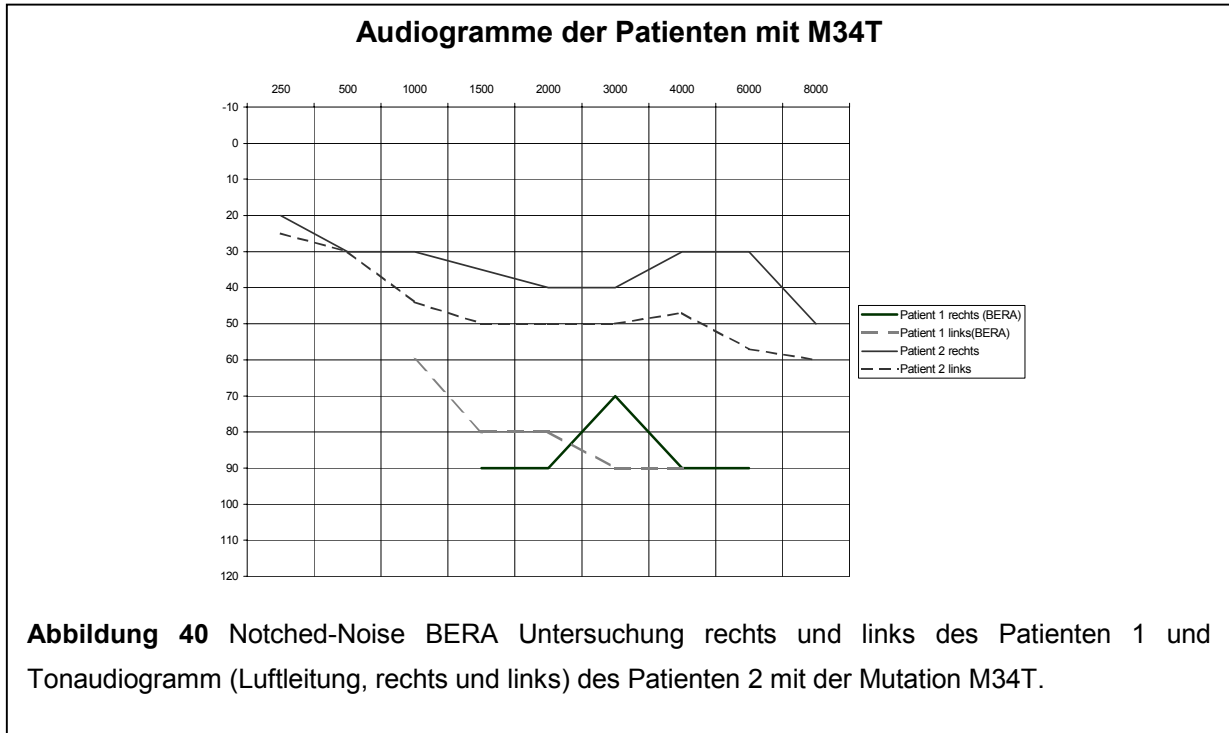
**Abbildung 38:** Audiogramme der Gdel35-heterozygoten Patienten (Reintonaudiometrie, Luftleitung – oben: rechtes Ohr – unten: linkes Ohr)

Zum Zeitpunkt der Audiometrie waren die Patienten im Durchschnitt (Mittelwert) 17 Jahre alt, der jüngste Patient war 3 Jahre (Patient 2). Auffälligerweise zeigten alle Patienten im Audiogramm eine sogenannte mediocochleäre Senke (Dämpfung bei 2000 Hz zwischen 40 und 60 dB). Demzufolge war bei allen Patienten der mediocochleäre Bereich betroffen.

Der basocochleäre Bereich (Hochton) zeigte unterschiedliche Verläufe, ließ jedoch in allen Fällen zunächst ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Ansteigen im Hochtonbereich erkennen (Ausnahme Patient 1, rechts). Im Bereich um 8.000 Hz verschlechtert sich die Hörfähigkeit allgemein jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Der pädaudiologischen Diagnose zufolge waren die Patienten in unterschiedlichem Maße betroffen, bei Patient 1 und 2 war diese mittelgradig, bei Patient 3 geringgradig.

### 5.3.2.2 M34T

Die Abbildung 39 im Anhang zeigt das Bild einer heterozygoten M34T Mutation. Insgesamt wurden zwei heterozygote Fälle einer M34T Mutation entdeckt (Allelfrequenz 1%).



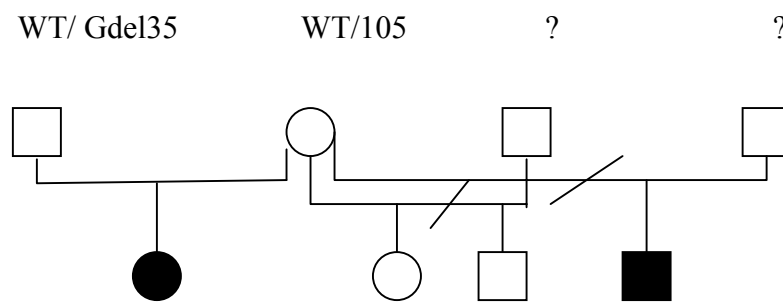
Bei den hier beschriebenen Fällen handelt es sich um Patientinnen deutscher Abstammung. Abbildung 40 stellt die Werte der Notched-Noise BERA Untersuchung rechts und links des Patienten 1 und das Tonaudiogramm (Luftleitung) des Patienten 2 dar.

Das Alter der Patientin 1 zum Zeitpunkt des Audiogrammes war 4 Jahre. Aufgrund des Alters und des Ausmaßes der Schwerhörigkeit wurde bei diesem Kind eine weiterführende Untersuchung mithilfe auditorisch evozierter Potentiale (AEP) vorgenommen. Die weiteren audiologischen Untersuchungen erfolgten durch die pädaudiologische Abteilung der Universität Münster und waren zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abgeschlossen. Patientin 2 war zum Zeitpunkt der pädaudiologischen Untersuchung 10 Jahre alt. Das Ausmaß der Schwerhörigkeit wurde bei Patientin 1 (Pat.1) hörrestig und bei Patientin 2 geringgradig (rechts)/ mittelgradig (links) (Pat.2) beschrieben. Sie betrafen den gesamten Frequenzbereich. Ein sporadischer Fall (Patient 1) und ein familiärer (Patient 2) sind dokumentiert.

### 5.2.3.2.3 105, 314-327del(14)

Die Mutation wurde bei einem schwerhörigen Patienten als compound heterozygote Mutation gefunden. Bei der Untersuchung der Familie des Patienten wurden weitere drei heterozygote Verwandte mit dem Genotyp 105/ Wildtyp identifiziert. Weil alle drei heterozygoten Verwandten keine Schwerhörigkeit aufwiesen, wurden sie bei der Berechnung der Prävalenz der Mutation nicht berücksichtigt. Der Stammbaum der Familie ist vereinbar mit einem rezessiven Erbgang (Siehe Abbildung 41).

**Abbildung 41: Stammbaum der Familie**



**Legende Abbildung 41:**



= männliches Individuum,



= männliches betroffenes Individuum,



= weibliches Individuum,



= weibliches betroffenes Individuum



= verheiratet



= geschieden

Keiner der Individuen, die den Genotyp 105/ WT aufwiesen, litten an einer manifesten Schwerhörigkeit.

## **6. Diskussion**

### **6.1 Genetisch - epidemiologische Aspekte**

In diesem Kapitel werden zunächst die Prävalenzen in den einzelnen Patientengruppen diskutiert. Es erfolgt eine kritische Darstellung der Zusammensetzung der Patientengruppen.

#### **6.1.1 Zusammensetzung der Patientengruppe**

Zu Beginn der Studie fiel auf, dass häufig Patienten, die nur einseitig schwerhörig waren im Patientengut vorkamen. In der Annahme, dass bei eindeutig einseitig erkrankten Patienten eine traumatische Genese der Schwerhörigkeit wahrscheinlicher sei, wurde ab diesem (frühen) Zeitpunkt eindeutig einseitig erkrankte nicht mehr in die Studie aufgenommen. Eine Studie von Denoyelle (Denoyelle et al., 1999) mit einem Vergleich der Assymetrie der Schwerhörigkeit von biallelischen Connexin26 Mutationen betroffenen Patienten zeigt, dass diese Annahme nur tendenziell richtig war. Von vielen Autoren wird hingegen bestritten, dass Connexin26 Mutationen nur zu einer beidseitigen symmetrischen Schwerhörigkeit führen (Denoyelle et al., 1999; Cohn et al., 1999 a). Im Folgenden soll die Patientengruppe betreffend geographischer Herkunft und Alter der Schwerhörigkeit diskutiert und mit anderen Studien diesbezüglich verglichen werden, um eine Präselektion durch Kriterien der Patientengruppe auszuschließen. Der Vergleich mit anderen Studien dient der Bewertung unterschiedlicher Ergebnisse.

##### **6.1.1.1 Erfassung ethnischer Unterschiede**

Die Mutationsprävalenzen sind in einzelnen Bevölkerungen und einzelnen ethnischen Patientengruppen unterschiedlich beschrieben worden (Storm et al., 1999; Lench et al., 1998 b). Die genaue Bestimmung der ethnischen Herkunft, die bei der Beurteilung der ethnischen Unterschiede im Mutationsmuster und in der Mutationsfrequenz eigentlich von Bedeutung wäre, ist in der Praxis außerordentlich problematisch. In dieser Arbeit wurde soweit wie möglich die geographische Herkunft dokumentiert. Damit lassen sich mit den bereits erwähnten Einschränkungen (siehe 4.1.6.1) Aussagen über die ethnische Abstammung der Patienten treffen. In über 87% der Fälle konnten entsprechende Angaben dokumentiert werden. Die Gründe für fehlende Angaben bei den übrigen Probanden waren Verständigungsprobleme, Adoption und die Unmöglichkeit, diese nachträglich zu erheben. Auch wenn unter diesen Grundannahmen unsere Einteilung valide ist, waren die Patientengruppen aufgrund ihres geringen und unterschiedlichen Umfangs für statistische Berechnungen nicht geeignet. Grundanliegen der vorliegenden Arbeit war jedoch, das

Patientengut einer deutschen pädaudiologischen Poliklinik so umfassend wie möglich zu charakterisieren und damit die für die dortige diagnostische Arbeit notwendigen Grunddaten zu liefern. Da für das Patientengut die geographische Herkunft unerheblich ist, können hier also valide Aussagen zur Mutationsverteilung und Häufigkeit von Cx26-Mutationen im Krankengut der Klinik getroffen werden.

Die Beobachtung in dieser Untersuchung, dass Mutationen auf dem Connexin26 Gen in der Gruppe der mitteleuropäischen Patienten in 10% (mutierte Allelfrequenz) und in der südosteuropäischen Gruppe wesentlich häufiger (in 15% der sequenzierten Allele) vorkamen, ist durchaus vereinbar mit den Berichten, wonach in mediterranen Patientengruppen Mutationen auf dem Connexin26 Gen häufiger vorkommen als in nordeuropäischen (Estivill et al., 1998; Lench et al., 1998 b). Wegen der sehr unterschiedlichen Gruppengrößen (59 gesichert mitteleuropäische / 17 gesicherte südosteuropäische) ist diese Aussage jedoch nicht statistisch zu untermauern.

#### **6.1.1.2 Beschreibung des Erkrankungsalters**

Wichtig für die Diskussion der Ergebnisse der audiologischen Untersuchungen ist die Kenntnis des Alters der Probanden zum Zeitpunkt Aufnahme in die Studie. Die Reinton-Audiometrie zur Feststellung der Schwerhörigkeit ist eine sehr subjektive Methode und ihre Aussagekraft ist abhängig von der verwendeten Apparatur, vom Untersucher und schließlich von der Mitarbeit und damit auch vom Alter des Patienten (Wolf, 2001). In einigen Studien wird, wegen der Schwierigkeiten der Durchführung eines Audiogramms bei sehr kleinen Kindern, ein Alter von mindestens vier Jahren zum Zeitpunkt des Audiogramms gefordert (Denoyelle et al., 1999) und bei jüngeren Kinder andere Untersuchungsmethoden angewandt (Mueller et al., 1999). Das Durchschnittsalter der Patienten in unserer Studie lag bei sieben Jahren. In diesem Alter sind audiometrische Untersuchungen in den meisten Fällen gut möglich.

Soweit in dieser Studie die Prävalenz von Mutationen in einer Patientengruppe und nicht die Korrelation zu einem bestimmten Phänotyp im Vordergrund stand, wurde analog zur Studie von Cohn et al. (Cohn et al., 1999 a) das Alter der Patienten nicht berücksichtigt. Bei den Betrachtungen zur Genotyp/Phänotyp-Korrelation hingegen müssen die unterschiedlichen Voraussetzungen der Diagnostik bei den Patienten jeweils gesondert diskutiert werden. Deshalb wird auch das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnose bzw. des erstmaligen Verdachtes der Schwerhörigkeit jeweils betrachtet. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass der Median des Alters zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung sich in den einzelnen Patientengruppen unterscheidet. Dabei fiel ein Unterschied in den Patientengruppen bezüglich der Ausprägung der Hörstörung auf: Mit zunehmenden Schweregrad der Hörstörung nimmt der Median des Alters beim erstmaligen Verdachts ab. Die einfachste Erklärung hierfür wäre eine verspätete Diagnose bei geringer ausgeprägter Schwerhörigkeit. Statistische Aussagen zur Signifikanz konnten aufgrund der geringen Fallzahlen und unterschiedlichen Gruppengrößen auch hier nicht durchgeführt werden. Allerdings spricht die Differenz des Parameters „Alter bei Verdacht“ in den Assymetriegruppen 0; 1 (Mittelwert: 4,3 Jahre) und Assymetriegruppen 2;3 (Mittelwert: 6,7 Jahre) für diese Interpretation.

Die DFNB1-assoziierte Schwerhörigkeit wird als frühkindlich oder prälingual beschrieben (Mueller et al., 1999). Da aber der Schweregrad der Hörstörung differiert (Denoyelle et al., 1999) und der Spracherwerb vom Schweregrad der Hörstörung anhängt, ist anzunehmen, dass auch Patienten, deren Schwerhörigkeit erst postlingual auffällt, von einer DFNB1-Mutation betroffen sein können. Vor diesem Hintergrund wurden in diese Studie nicht nur Fälle aufgenommen, die eine eindeutig prälinguale Schwerhörigkeits-Anamnese aufwiesen. In zahlreichen anderen Untersuchungen (z.B.(Denoyelle et al., 1999)) fanden sich ebenfalls die prälingualen Hörstörung nicht als Einschlusskriterium. Gründe hierfür lagen nicht zuletzt auch in der stark erschwerten - oft unmöglichen - Diagnose einer prälingualen Hörstörung und der generellen Schwierigkeit, im Nachhinein den Manifestationszeitpunkt einer Schwerhörigkeit zu eruieren.

#### **6.1.1.3 Vergleich der gefundenen Prävalenzen von DFNB1 und Gdel35-Mutationen mit anderen Studien**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ging es in dieser Arbeit vorwiegend darum, im Vergleich zu Vorarbeiten aus südeuropäischen Ländern mit hohen Prävalenzen von Mutationen auf Exon2 des Connexin26-Gens diese Daten für das deutsche Patientengut zu erheben. Unter diesem Aspekt wurde – wie auch in den zitierten Arbeiten - nur das Exon2 des Cx26-Gens sequenziert. In der Folge sind in der Literatur in einigen wenigen Fällen auch Mutationen in Exon 1 beschrieben worden (Houseman et al, 2001), die für unsere Betrachtungen nicht berücksichtigt wurden. In 8,6% der sequenzierten Allele wurde eine Gdel35 Mutation auf dem Connexin26 Gen gefunden. 11,5 % aller Patienten wiesen mindestens eine Gdel35 Mutation auf. Diese Daten entsprechen grundsätzlich den Daten, die Kupka inzwischen für eine mitteldeutsche Bevölkerung nachweisen konnte (Kupka et al., 2000). In seiner Studie wiesen jedoch nur 8% der Patienten eine Gdel35 Mutation auf. Bei der



in dieser Arbeit gewählten Darstellung blieb allerdings der jeweilige Genotyp (homozygot/heterozygot) der Patienten außer Betracht. Rechnet man die von Kupka publizierten Daten diesbezüglich um, ergibt die Metaanalyse eine Prävalenz von Gdel35 Mutationen in 10,4% aller sequenzierten Gene. Dieses Ergebnis ist mit den in dieser Studie gefundenen Daten (11,5 % aller sequenzierten Allele mutiert) vergleichbar. In einer weiteren Studie an deutschen Patienten stellte Gabriel fest, dass bei Patienten mit mindestens hochgradiger Schwerhörigkeit (n=134 Patienten) 22% eine Mutation auf dem Connexin26 Gen aufwiesen (Gabriel et al., 2001). Die hier vorliegende Arbeit bestätigt dieses Ergebnis (23% der sequenzierten Allele mindestens hochgradig betroffener Patienten weisen eine Mutation auf dem Connexin26-Gen, Exon2, auf). In dieser Gruppe gab Gabriel den Anteil der Gdel35-Mutation mit 83% an (Gabriel et al., 2001), dies entspricht genau den Ergebnissen unserer Gesamtgruppe (83%) und findet sich auch für die Gruppe der mindestens hochgradig betroffenen Patienten (85% Gdel35) wieder.

Verglichen mit Daten aus dem südeuropäischen Raum, bei denen in über 42% der Patienten, die an einer familiären oder sporadischen Hörstörung litten, eine Mutation auf dem Connexin26 Gen gefunden wurde (Estivill et al., 1998), liegen die Fälle in der mitteleuropäischen (deutschen) Bevölkerung in allen vorliegenden Studien deutlich niedriger. Die von Estivill publizierten Ergebnisse müssen allerdings insofern kritisch beleuchtet werden, da bei einem Teil der Patienten schon zuvor eine genetische Kopplung der Hörstörung an den Locus DFNB1 gezeigt worden war. Aus diesem Sampling-Bias ergibt sich, dass die tatsächlichen Prävalenzen in der südeuropäischen Bevölkerung wahrscheinlich niedriger angesetzt werden müssen als bisher angenommen.

Zusammenfassend konnten in unserer Studie die Beobachtungen, die von Lench et al. (Lench et al., 1998 b) in belgischen und englischen Patientengruppen gemacht wurden von uns auch für eine deutsche Patientengruppe bestätigt werden. Dazu passt auch, dass in Studien zur Populationsfrequenz von Connexin26-Mutationen in unterschiedlichen Bevölkerungen kaum ein Unterschied zwischen der englischen und deutschen Bevölkerung zu erkennen war (Gasparini et al., 2000; Storm et al., 1999). Dies stützt die Annahme, dass die Prävalenz von Cx26-Mutationen bei schwerhörigen Patienten für die englische/belgische und die deutschen Bevölkerung ähnlich ist und dass in mitteleuropäischen Patientengruppen eine Mutation auf dem Locus DFNB1 seltener für genetischen Schwerhörigkeit verantwortlich ist als in südeuropäischen. Gründe für Unterschiede in der mitteleuropäischen und südeuropäischen Bevölkerung können durchaus in den unterschiedlichen Prävalenzen der einzelnen Populationen liegen. Allerdings müssen auch Bias durch die Studiendurchführung und

statistische Fehlinterpretationen in der Beurteilung berücksichtigt werden. Eine Möglichkeit statistische Fehlinterpretationen auszuschließen, bestünde in der Zusammenführung der Daten aus mehreren Studien um höhere Fallzahlen zu erreichen. Da sich die Studien jedoch bezüglich ihrer Einschlusskriterien und ihrer Patientenzusammensetzung grundlegend unterscheiden, ist diese Metaanalyse ohne weiteres derzeit nicht möglich.

#### **6.1.1.4 Rolle des Vererbungsmodus**

Kellsell et al (Kellsell et al., 1997) beschrieb 1997 rezessive wie auch dominante Erbgänge für Mutationen auf dem Connexin26 Gen Exon2. Bisher sind nur wenige dominante Mutationen gesichert (Carrasquillo et al., 1997; Martin et al., 1999). Einige zuvor als dominant beschriebenen Mutationen (M34T) auf dem Connexin26 Gen werden hingegen inzwischen angezweifelt (Scott et al., 1998; Gabriela, 1998; White et al., 1998; Wilcox et al., 1999). In dieser Studie wurden – mit einer Ausnahme (M34T) - nur als rezessiv beschriebene Mutationen vorgefunden. Die Eltern homozygoter Patienten wurden von uns als obligat heterozygote Individuen untersucht. Dabei fiel auf, dass diese obligat Heterozygoten keine detektierbare Hörstörung aufwiesen. Auch bei compound heterozygoten Patienten wurden die obligat heterozygoten Familienangehörigen klinisch untersucht. Auch dabei konnte keine eindeutig zuweisbare Hörstörung diagnostiziert werden (M. Roskos, persönl. Mitt.). Die bei den obligat heterozygoten Patienten erhobenen Befunde machen somit eine autosomal-rezessive Wirkung der untersuchten Mutationen hoch wahrscheinlich.

Diesen Untersuchungsergebnissen scheint zu widersprechen, dass die homozygoten im Schnitt einen schwereren Phänotyp aufweisen als heterozygote Patienten. Geht man jedoch davon aus, dass für schwerhörige Patienten, die eine Mutation auf nur einem Allel des Exon2 des Connexin26 Genes aufweisen, eine weitere Mutation auf einem anderen im funktionellen Zusammenhang stehenden Gen, mitverantwortlich sein kann (s.o.), ist dies durchaus nachvollziehbar: Während zwei defekte, unterschiedliche Gene (compound genotype), die in funktionellem Zusammenhang stehen, sich eventuell noch gegenseitig kompensieren könnten, ist ein Ausfall des gesamten Gens (z.B. Cx26) (homozygot, compound heterozygot) schwerer kompensierbar. Für diese Interpretation spricht auch, dass in dieser Studie alle compound heterozygoten Patienten an einer hochgradige Schwerhörigkeit erkrankt waren.

Die zunächst paradoxe Tatsache, dass eine einzelne Gdel35 Mutation sowohl bei erkrankten wie auch bei phänotypisch unauffälligen Individuen vorkommt, lässt sich entweder mit einer unerkannten, weiteren Mutation z.B. auf dem Non-Coding Exon1 des Connexin26 Genes erklären (wie dies für die Mutation M34T diskutiert wird (Houseman et al., 2001) oder aber –

in Kenntnis der Interaktionsmöglichkeiten der Connexine (heteromere/homomere, heterotypische/homotypische Untereinheiten)- als digenischer oder polygenischer Vererbungsmodus. Derzeit werden unter anderem Homologien mit Connexin32, welches bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung eine Rolle spielt, diskutiert (Denoyelle et al., 1999).

## **6.2 Klinische Aspekte**

### **6.2.1 Schweregrad der Schwerhörigkeit in der Patientengruppe**

Die hier untersuchte Patientengruppe war gleichmäßig bezüglich der Schweregrade der Schwerhörigkeit verteilt. In den meisten anderen Studie stellte sich die Stichprobe der untersuchten Patienten ähnlich dar (Denoyelle et al., 1999; Green et al., 1999; Gabriel et al., 2001). Der Vergleich mit anderen Studien lässt sich aber nur bedingt führen, da unterschiedliche Einteilungen des Schweregrades verwendet wurden (Cohn et al., 1999 a ).

### **6.2.2 Beschreibung der Cx26(GJB2)-assoziierten Schwerhörigkeit**

Für Schwerhörigkeit, die dem Locus DFNB1 zugeordnet wird, gibt es keinen klar definierbaren Phänotyp (Carrasquillo et al., 1997; Denoyelle et al., 1999; Green et al., 1999). Im Allgemeinen kann man allerdings feststellen, dass sich die mit dem DFNB1 Locus bzw. mit der Mutation Gdel35 im Connexin26-Gen assoziierte Schwerhörigkeit in den nachfolgend ausgeführten Charakteristika beschreiben lässt.

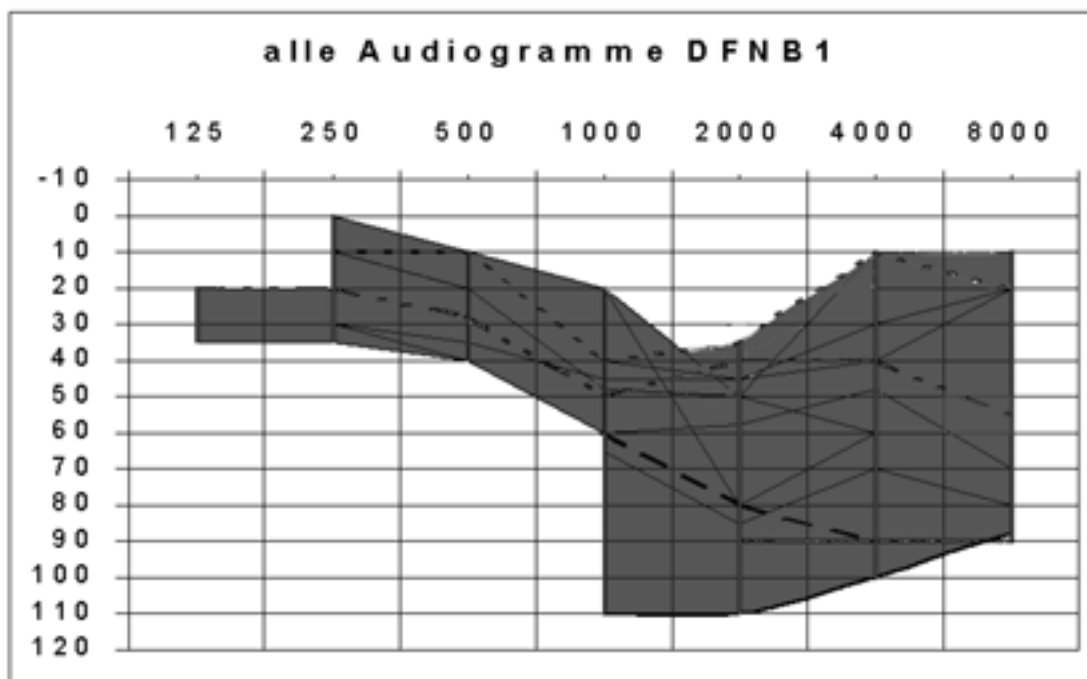
#### **6.2.2.1 Schweregrad**

Mit einer Studie über die klinischen Erscheinungsbilder von Patienten (Cohn et al., 1999 a) konnte belegt werden, dass 2/3 der Patienten, die eine Mutation auf dem Connexin26-Gen besaßen, an einer hochgradigen bzw. hörrestigen Schwerhörigkeit litten. Die meisten Studien über die Ausprägung der Schwerhörigkeit kamen zu dem Ergebnis, dass in nur seltenen Fällen geringgradige Schwerhörigkeit mit dem DFNB1-Locus und damit vermutlich mit dem Connexin26-Gen assoziiert ist (Cohn et al., 1999 a; McGuirt und Smith, 1999; Mueller et al, 1999). Intrafamiliär wird gelegentlich eine unterschiedliche Ausprägung des Schweregrades (Expressivität) beschrieben (McGuirt und Smith, 1999). Cohn und Kelley wiesen darauf hin, dass ein Problem bei dieser Einschätzung in der Verzerrung durch die unterschiedlichen und überschneidenden Einteilungen der Schwerhörigkeit liegt (Kelley et al., 1998; Cohn und

Kelley, 1999 b). In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt werden. So lagen in der Gruppe der mindestens hochgradig schwerhörigen Patienten die meisten Mutationen auf dem Connexin26-Gen (bei annähernd gleichmäßig verteilter Grundgesamtheit).

#### **6.2.2.2 Betroffene Frequenzen**

Ein typisches Audiogramm für Patienten mit Cx26-Mutationen und deren betroffene Frequenzen, wird nicht beschrieben (McGuirt und Smith, 1999). Denoyelle (Denoyelle et al., 1999) berichtet aber in einer Studie über den Phänotyp von DFNB1-assoziierten Schwerhörigkeiten, dass die von DFNB1-Mutationen betroffenen Patienten in einer Einteilung der Audiogramme sich nach ihrer Form (Ascending, U-Shaped, Flat, Gently sloping, Sharply sloping, Residual) von den nicht-DFNB1 assoziierten signifikant unterscheiden. In einer Gruppe von 54 DFNB1-assoziierten Patienten fand er in keinem Fall eine überwiegende Beeinträchtigung der mittleren oder tiefen Frequenzen (keine u-förmigen oder ascending Audiogramme). Die Diagramme werden überwiegend als flat oder sloping beschrieben. Eine DFNB1-typische Audiogrammform wurde dennoch nicht postuliert (Denoyelle et al., 1999). Auch unsere Studie ergibt keine typischen Audiogramme für DFNB1-assoziierte Schwerhörigkeit. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Denoyelle (Denoyelle et al., 1999) waren in dieser Studie allerdings alle Typen von Audiogrammen vorhanden: Ascending U-shaped, Flat, Gently sloping, Sharp sloping, Residual, siehe Abbildung 42.



**Abbildung 42:** übereinander gelagerte Audiogramme (n=12) (recht und links) aller Patienten, die eine Mutation auf dem Connexin26 Gen, Exon2 aufwiesen. Trotz der niedrigen Fallzahl fällt die breite Streuung auf. Eine Zuordnung der Phänotypen (Audiogramme) zu den einzelnen Mutationen scheint daher sinnvoller als die generelle Zuordnung zum Locus DFNB1.

### **6.2.2.3 Assymetrie der Hörstörung**

Lagenbecks Postulat, wonach eine genetisch bedingte Schwerhörigkeit beidseitig ist, scheint nur begrenzt Gültigkeit zu besitzen (Königsmark und Gorlin, 1976). So konnte bei Patienten mit einer Connexin26-Mutation eine Lateralisation nachgewiesen werden (Cohn et al., 1999 a). In einer anderen Studie wurde jedoch beschrieben, dass beide Ohren immer einen ähnlichen Schweregrad zeigen (Denoyelle et al., 1999). Cohn führt dies auf unterschiedliche Kriterien der Lateralisation zurück (Cohn und Kelley, 1999 b). In dieser Studie wurde die Einteilung von Denoyelle angepasst an die in dieser Studie gewählte Einteilung der Schwerhörigkeit verwendet. (siehe 4.1.6.4, Einteilung der Assymetriegruppen, Tabelle 11) Mit diesen Annahmen unterstützen unsere Ergebnisse eher die Aussage, wonach die DFNB1-assoziierte Schwerhörigkeit sich regelhaft als bilaterale Schwerhörigkeit manifestiert. Allerdings waren unsere Gruppen unterschiedlich groß (Grad 0 = 91 Fälle, Grad 2 = 0 Fälle) und die Aussage stützt sich nur auf 12 Fälle womit sie insgesamt zu relativieren ist.

Die Tatsache, dass in der Patientengruppe, die eine Lateralisation aufwies, der sporadische Erbgang häufiger auftrat, kann unter Berücksichtigung von Lagenbecks Gesetz der Symmetrie (s.o.) als eine Bias im Sinne einer Fehlannahme eines genetischen Hintergrundes interpretiert werden: Bei einem Patienten, der als Einzelkind an einer Schwerhörigkeit erkrankt (sporadischer Fall) ist eine Fehlannahme einer genetischen Ursache wahrscheinlicher, als bei einem Patienten, dessen Geschwister ebenfalls an Schwerhörigkeit leiden. Diese Tatsache könnte somit indirekt Aufschluss über die Qualität der Patientenselektion geben. Nach der zuvor geäußerten Annahme wäre ein Vorkommen gleicher Anteile von Fällen der Lateralisation, sowohl in der Gruppe der sporadischen als auch in den familiären Fällen ein Merkmal, das für das gleichmäßig verteilte Vorliegen von genetischen Ursachen spricht. Auch unser Nachweis, dass Mutationen auf dem Connexin26 Gen in der Gruppe der familiären Fälle (13% der Allele) wesentlich häufiger vorkamen als in der Gruppe der sporadischen Fälle (6% der Allele), kann im Sinne einer häufigen Fehleinschätzung des genetischen Hintergrundes der Schwerhörigkeit in der Gruppe der Patienten mit sporadischer Schwerhörigkeit interpretiert werden.

### **6.2.2.4 Progression**

Nicht eindeutig zu beantworten ist die Frage nach einem möglichen Zusammenhang von Cx26-Mutationen als Ursache einer Schwerhörigkeit und ihrer Progression. Denoyelle geht davon aus, dass die DFNB1-assoziierte Schwerhörigkeit nicht oder nur geringfügig progredient ist (Denoyelle et al., 1999). Dem entgegen wurde der Verdacht geäußert, dass die

unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen im Zusammenhang mit den selben Cx26-Mutationen durch einen progrediente Verlauf (Cohn et al., 1999 b), zumindest im Fall der Gdel35 Mutation, verursacht werden. Demzufolge müsste bei den von Gdel35-Mutationen betroffenen Patienten eine Korrelation zwischen Schweregrad der Störung und dem Alter vorliegen. Dies konnte anhand unserer Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit in der Regel nur der Hörverlust zum Zeitpunkt des Studieneintritts einmalig bewertet wurde, kann keine Aussage bezüglich einer möglichen Progredienz der untersuchten Fälle getroffen werden. Der Vergleich mit den Daten in anderen Studien war wegen der widersprüchlichen Beurteilungskriterien nicht möglich.

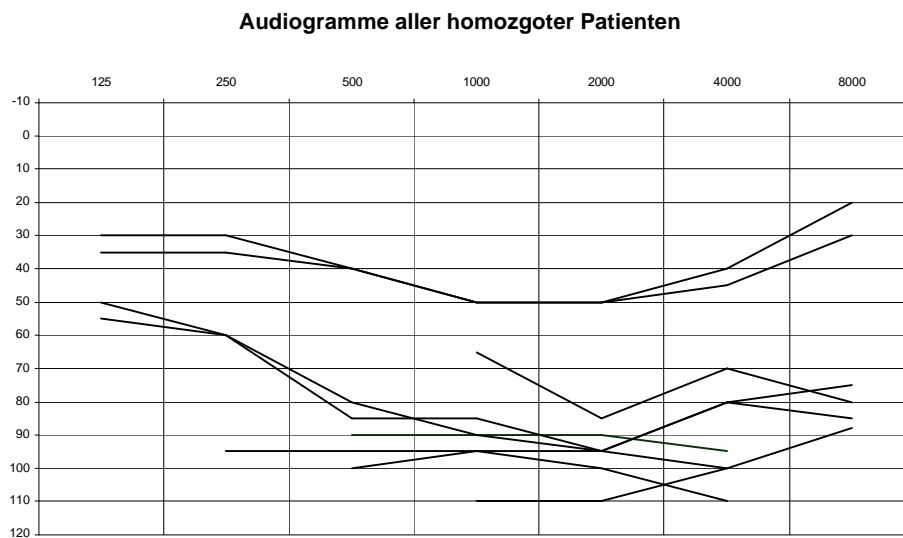
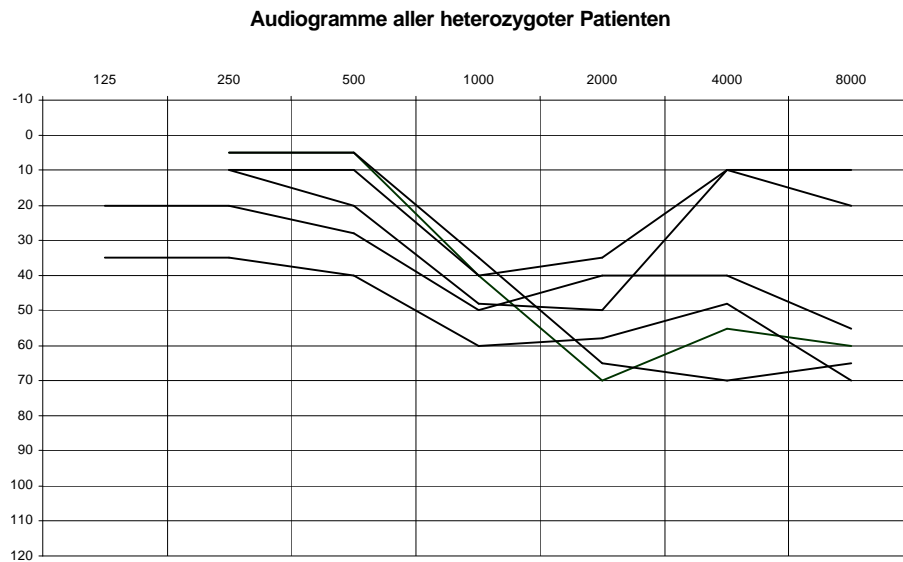
### **6.2.3 Diskussion der Audiogramme für die gefundenen Genotypen**

#### **6.2.3.1 Gdel35**

Das Durchschnittsalter der von Gdel35 Mutationen heterozygot Betroffenen lag bei 27 Jahren, der jüngste Patient war 4 Jahre alt. In diesem Alter ist eine Untersuchung der Schwerhörigkeit meistens valide. Bei der Betrachtung der homozygoten Fälle mussten unter diesem Gesichtspunkt Abstriche vorgenommen werden. Zwei Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung erst drei Jahre alt und die audiologischen Untersuchungsergebnisse konnten deshalb nur sehr vorsichtig interpretiert werden. Da es sich hierbei aber in einem Fall um eine BERA handelte, deren Werte in die Audiogramm-Kurven eingetragen wurden, konnten diese, in Kenntnis des Sachverhaltes, vorsichtig in die Bewertung der Audiogramme mit einbezogen werden. In den familiären Fällen, in denen eine Gdel35 Mutation vorhanden war, konnte auch bei der audiologischen Untersuchung der primär phänotypisch unauffälligen Familienmitglieder, die eine Gdel35 Mutation aufwiesen (obligat heterozygote), keine Hörstörung eruiert werden (M. Roskos, persönl. Mitt.). Demzufolge war der Vererbungsmodus in den hier vorgefundenen Fällen der Gdel35 Mutation eindeutig autosomal rezessiv.

### 6.2.3.1.1 Betroffene Frequenzen und Schweregrad

#### Audiogramme aller Patienten mit min. einer Gdel35 Mutation



**Abbildung 43:** überlagerte Audiogramme aller Patienten mit heterozygotem Genotyp (oben) und homozygotem Genotyp (unten). Körperseiten wurden nicht getrennt aufgetragen, es erfolgte keine Differenzierung nach Luft oder Knochenleitung. Bei den Fällen, für die keine Audiogramme erhoben werden konnten, wurde die BERA-Untersuchung (ipsilaterales Ohr vertäubt) angeführt.



Es konnte in dieser Studie kein typischer Phänotyp für Patienten mit Connexin26-Mutationen gefunden werden. Die Tendenzen, die auch von anderen Autoren (Denoyelle et al., 1999) (Cohn et al., 1999 a; Cohn und Kelley, 1999 b) beschrieben wurden, fanden sich auch in dieser Untersuchung wieder (unterschiedlicher Schweregrad von geringgradig bis hörrestig und in den meisten Fällen bilateral (Cohn und Kelley, 1999 b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Gdel35 Mutation derzeit keinem typischen Phänotyp definitiv zuzuordnen ist.

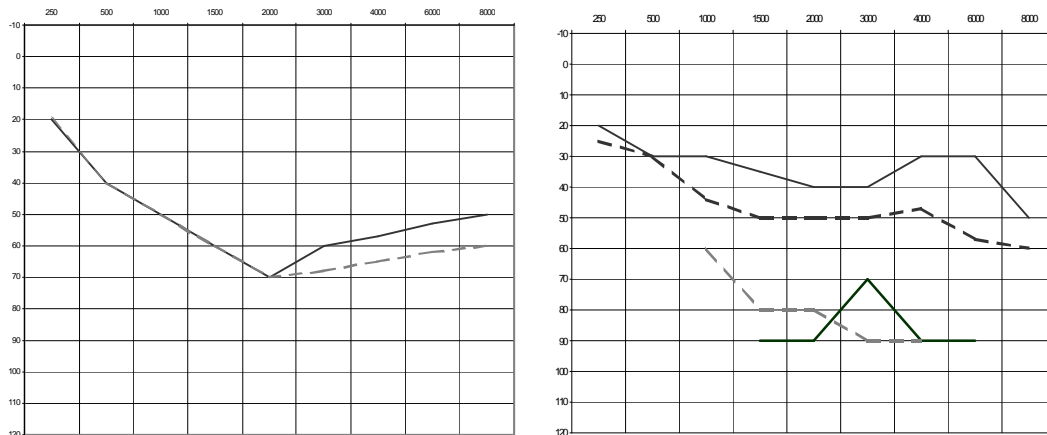
Unsere Ergebnisse legen allerdings den Schluss nahe, dass Gdel35 homozygote Patienten generell stärker betroffen sind als heterozygote Patienten (siehe auch Abbildung 43). Dieser Trend wird in anderen Studien nicht bestätigt, die Fälle von homozygoten Patienten beschreiben, die an einer geringgradigen Schwerhörigkeit leiden (Mueller et al., 1999).

#### **6.2.3.2 M34T**

Die Mutation wurde erstmalig von Kelsell et al. (Kelsell et al., 1997) beschrieben. Während man sie zunächst für eine dominante Mutation hielt, wurde sie vorübergehend als Allelvariante beschrieben, die mit der Ausprägung einer Schwerhörigkeit nicht zusammenhängt (Kelley et al., 1998), weil zwischenzeitlich Fälle publiziert wurden, in denen sie nicht mit Schwerhörigkeit segregierte. In in vitro Tests konnte jedoch inzwischen bestätigt werden, dass diese Mutation das „coupling“ von Zellen hemmt und damit funktionell wirksam ist. Vor kurzem konnten Housemann et al. (Houseman et al., 2001) nachweisen, dass diese Mutation bei non-syndromischen sensorineuralen Schwerhörigkeiten in England in über 3% vorkommt. Er konnte ferner in familiären Fällen belegen, dass die Schwerhörigkeit mit M34T im Sinne einer rezessiven Mutation segregiert. Eine Mutation (-493del10), die im nicht kodierenden Exon1 des Connexin26 Genes lag und die in dieser Studie bei fast allen Patienten, die eine M34T Mutation aufwiesen, ebenfalls vorlag, legt den Schluss nahe, dass diese Mutation zumindest im Kopplungsungleichgewicht, möglicherweise aber auch in funktionellem Zusammenhang mit der M34T Mutation steht. Weitere Untersuchungen zu dieser Thematik sind jedoch notwendig, auch im Hinblick auf das Zusammenspiel mit der Gdel35 Mutation.

Housemann beschrieb in seinem Artikel ein Audiogramm eines M34T homozygoten Patienten. Um unsere Fälle von heterozygoten Patienten vergleichen zu können wurde die Audiogramme in Abbildung 44 nebeneinander gezeigt.

### Audiogramme von Patienten mit M34T



**Abbildung 44:** Audiogramme von M34T heterozygoter Patienten (rechts) aus dieser Studie und das Audiogramm eine M34T homozygoten Patienten (links) (links Tonaudiometrie, beide Seiten dargestellt, (keine Angaben zu Luftleitung oder Knochenleitung) links Tonaudiometrie, Luftleitung (Patient 2) und BERA (Patient 1))

Patient aus der Studie von Houseman  
(Housemann et al., 2001)  
Genotyp 101C-T/101C-T  
Alter Patient: nicht bekannt

Patient 98/19 (Patient 1) und  
Patient00/024 (Patient 2)  
Genotyp :101C-T/ Wt  
Alter Patient 98/019: 6 Jahre  
Alter Patient 00/024: 10 Jahre

Obwohl es sich um denselben Genotyp handelt, ist der Schweregrad der Hörstörung der von uns untersuchten Patienten (Patient 1 + 2) sehr unterschiedlich. Offensichtlich lässt sich - auch im Vergleich zum publizierten homozygoten Genotyp - keine Aussage im Sinne einer für diese Mutation typischen Schwerhörigkeitsform machen. Eine Möglichkeit der Erklärung dieser diskrepanten Phänotypen wäre das Vorliegen eines compound heterozygoten Genotyps, bei dem eine jeweils unterschiedliche, zweite Mutation in Kombination mit der Mutation M34T in unterschiedlichen Phänotypen resultiert. Publierte Fälle mit M34T-heterozygoten Mutationen, bei denen keine Hörstörung nachgewiesen werden konnte, unterstützen diese These (Kelley et al., 1998; Scott et al., 1998).

### 6.2.3.3 Mutation 105

In unserem Patientengut konnte in einem Fall die Mutation 105 als compound heterozygoter Genotyp nachgewiesen werden.

Nach der Klonierung kann die WT-Sequenz (Wildtyp-Sequenz) von der mutierten Sequenz unterschieden werden (Tabelle 21):

<b>Tabelle 21:</b> Darstellung der Sequenzen der Mutation 105 und des Wildtyps	
Sequenz WT:	bp291 5'GCCTCTGTACTCTTCTTCTCCTTCAAGTAGTCCCCCTCTATTTCTCACTTAAA3'
Sequenz Mutation105:	bp291 5'GCCTCTGTACTCTTCTTCT-----CCCC TCTATTTCTCACTTAAA 3'

Aus der Beschreibung des Stammbaumes der Familie und der Audiogramme (siehe 5.2.3.2.3) ließ sich keine Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp erhalten. Weder obligat (Vater) noch fraglich obligat (Geschwister) heterozygote Träger dieser Mutation zeigten eine Einschränkung der Hörfähigkeit, so dass die Mutation klar als rezessiv definiert werden kann. In den Publikationen fanden sich keine Audiogramme, mit denen die Befunde der in dieser Studie untersuchten 105/Gdel35 Patienten verglichen werden hätten können.

## 6.3 Mögliche Anwendung der Mutationsdiagnostik im Connexin26 Gen zur Frühdiagnostik von Hörstörungen

Um eine Aussage über den Sinn einer Mutationsdiagnostik zu treffen, muss das „positive Testergebnis“ definiert werden. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten:

- 1) Eine definitive Diagnostik setzt die komplette Aufklärung des Genotyps voraus. Hier bedeutet die Aussage „positiver Test“, dass der Patient einen homozygoten oder compound heterozygoten Genotyp für zwei rezessive Mutationen oder einen heterozygoten Genotyp mit einer dominanten Mutation aufweist.
- 2) Eine Diagnostik, die den Verdacht auf eine genetisch bedingte Schwerhörigkeit mit einer definierten Wahrscheinlichkeit liefert, aber nicht letztlich beweist, kann sich bereits auf den Nachweis nur einer Mutation auf dem Connexin26 Gen stützen.

Eine diagnostische Anwendung von Mutationsdiagnostik des Connexin26 Genes in mitteleuropäischen Patienten mit frühkindlicher Schwerhörigkeit scheint auf der Grundlage der hier erhobenen Daten generell nicht aussichtsreich. Zwar konnte in 10,3% der sequenzierten Allele von Patienten mit kongenitaler oder früh-kindlicher Hörstörung eine Mutation, unabhängig von der Familienanamnese, nachgewiesen werden. Allerdings war in

nur 6,9 % der Fälle der komplette Genotyp mit der verwendeten Methodik aufzulösen, womit die diagnostische Empfindlichkeit der Mutationsanalyse sehr gering zu veranschlagen ist. Diagnostische Sensitivitäten oder Spezifitäten werden dabei nach folgender Tabelle (Tabelle 22) errechnet:

**Tabelle 22: Tafel für Berechnung der Sensitivität und der Spezifität**

	Individuen mit Schwerhörigkeit	Individuen ohne Schwerhörigkeit	Summe der Testergebnisse
<b>Testergebnis positiv</b>  (Genotyp komplett / inkomplett aufgeklärt)	(A)	(B)	(A+B)
<b>Testergebnis negativ</b>	(C)	(D)	(C+D)

Die Diagnostische Sensitivität und Spezifität berechnen sich basierend auf der oben aufgeführten Tabelle nach:

**Sensitivität:**  $(A) / (A) + (C)$

**Spezifität:**  $(D) / (B) + (D)$

### 6.3.1 Definitive Mutationsdiagnostik

Neben der unterschiedlichen Sensitivität der verschiedenen Mutationsdiagnostiken (definitiver vs. verdächtiger Genotyp, Definition siehe 6.3) müssen auch die unterschiedlichen Gruppen (Patienten mit hochgradiger/mittelgradiger/geringgradiger Schwerhörigkeit, Patienten mit sporadischer/ familiärer Schwerhörigkeit) einzeln betrachtet werden.

### 6.3.2 Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen Untersuchungen

Tabelle 23 zeigt Sensitivität und Spezifität der Mutationsdiagnostik für einen komplett aufgeklärten Genotyp (homozygote Mutationen oder compound heterozygote Mutationen)

**Tabelle 23: Sensitivitäten/Spezifitäten Mutationsdiagnostik (komplett aufgeklärter Genotyp)**

Patientengruppe	Nachweis von	Sensitivität	Spezifität
<b>Patientengruppe 2 (alle unabhängige Patienten)</b>	Allen Mutationen	6,9% (6/ (6+81) * 100%)	100% (5/(0+5)*100%)
	Gdel35 selektiv	5,7% (5/ (5+82)* 100%)	100% (5/(0+5)*100%)
<b>Patienten mit hochgradiger Schwerhörigkeit</b>	Allen Mutationen	21% (6/ (6+22)* 100%)	100% (59/(0+59)* 100%) (siehe Anmerkung 1)
	Gdel35 selektiv	18% (5/(5+23)* 100%)	100% (59/(0+59)*100%) (siehe Anmerkung 1)

**Anmerkung 1 zu Tabelle 23:**

Für die Berechnung der Spezifität in der Gruppe der Patienten mit mindestens hochgradiger Schwerhörigkeit wurde, für die Gruppe der „Individuen ohne Schwerhörigkeit“, die Anzahl der Individuen, die nicht an einer mindestens hochgradigen Schwerhörigkeit litten, verwendet. (87-28= 59 Individuen)

Tabelle 24 zeigt die Sensitivitäten und Spezifitäten für eine Mutationsdiagnostik mit inkomplett aufgeklärtem Genotyp (sowohl homozygote und compound heterozygote Mutationen als auch heterozygote Mutationen).

**Tabelle 24: Sensitivität/Spezifität Mutationsdiagnostik (inkomplett aufgeklärter Genotyp)**

Patientengruppe	Mutationsnachweis	Sensitivität	Spezifität
<b>Patientengruppe 2</b>	Alle Mutationen	13.8% (12/0,87)	Siehe Anmerkung 1
	Nur Gdel35	11.5% (10/0,87)	0,9% (11/ (11+1201)*100%  siehe Anmerkung 2
<b>Patienten mit hochgradiger Schwerhörigkeit</b>	Alle Mutationen	29% (8/(8+20)*100%)	95% (56/ (3+56)*100%  Siehe Anmerkung 3
	Nur Gdel35	25,0% (7/(7+21)*100%)	97% (57/(2+57)*100%)  Siehe Anmerkung 3

**Anmerkung 1 zu Tabelle 24:** Eine Berechnung der Spezifität im Falle eines inkomplett nachgewiesenen Genotypes war nicht möglich, da keine Daten zur Häufigkeit von Mutationen auf dem Connexin26 Gen in der Normalbevölkerung vorgelegen haben. Es fanden sich in der Literatur jedoch Angaben über die Häufigkeit der Gdel35 Mutation. Das Vorkommen dieser Mutation in der „gesunden“ Bevölkerung schwankte hierbei je nach geographischer Population zwischen 1/22.5 (Estland) bis 1/200 (Frankreich) (Gasparini et al., 2000). Da jedoch bekannt war, dass die Mutation Gdel35 den größten Teil der Mutationen, die auf dem Connexin26 Gen gefunden werden, ausmachte (hier: 83%, ähnlich Werte in anderen Studien), konnte zur Abschätzung der Spezifität für diesen Fall annäherungsweise die Spezifität betrachtet werden, die sich aus der Häufigkeit der Gdel35 Mutation in der „gesunden“ Bevölkerung ergab. Schätzungsweise ist die Spezifität für den Nachweis aller Mutationen minimal größer als die Spezifität für den selektiven Nachweis der Gdel35 Mutation.

**Anmerkung 2 zu Tabelle 24:** Für die Berechnung der Spezifität eines Testes, der nur die Gdel35 Mutation nachwies, wurden Daten aus der Studie von Janecke et al verwendet. (Janecke et al., 2002) Diese beschrieben in einem österreichischen Patientenkollektiv insgesamt ähnliche Prävalenzen wie diese Studie. Janecke et al untersuchten in ihrer Studie ebenfalls 1212 Kontrollen und errechneten eine Trägerfrequenz von 0,9%. (1/110) Da diese Studiengruppe ansonsten ähnliche Ergebnisse fand, wurden diese Prävalenzen zur Berechnung der Spezifität annäherungsweise herangezogen.

**Anmerkung 3 zu Tabelle 24:** Analog zu Anmerkung 2 (Tabelle 25) wurde für die Betrachtung der Spezifität hier für die Gruppe der Patienten ohne Schwerhörigkeit (B+D), die Gruppe der Patienten, welche nicht an einer mindestens hochgradigen Schwerhörigkeit litt, verwendet. (n= 59) In dieser Gruppe ließ sich in vier Fällen eine Mutation auf mindestens einem Connexin26 Gen nachweisen.

### **6.3.3 Zusammenfassende Bewertung der Mutationsdiagnostik**

Basierend auf den beschriebenen Daten scheint ein genereller Einsatz einer Mutationsdiagnostik durch Sequenzieren des gesamten Exon2 des Connexin26 Genes nicht erfolgsversprechend. Beurteilt man die zu erzielende diagnostische Sensitivität zusammen mit den hergeleiteten Spezifitäten, lässt sich eine diagnostische Anwendung nur für die Gruppe der Patienten mit hochgradiger Schwerhörigkeit überhaupt in Erwägung ziehen. Hier zeigte sich, dass eine Sequenzierung des Connexin26 Gens mit einer Sensitivität von 29% respektive 25% die Hörstörung erfassen kann. Bei deutlich niedrigerer Sensitivität scheint trotz der einfacheren und finanziell weniger aufwendigen Durchführung der selektive Nachweis der Gdel35 Mutation nicht sinnvoll.

In der Gruppe der mindestens hochgradig schwerhörigen Patienten könnte durch eine genauere Untersuchung des Phänotypes der Schwerhörigkeit künftig eventuell eine Gruppe definiert werden, die eine Mutationsdiagnostik mit höherer Sensitivität und Spezifität erlaubt. Für eine genetische Beratung könnte – ein autosomal rezessiver Erbgang vorausgesetzt - der Nachweis von nur einer Mutation auf Exon2 des Connexin26 Gens als Hinweis auf das Risiko einer Schwerhörigkeit eines weiteren Kindes dienen. Neben der für alle autosomal rezessiven Erkrankungen gültigen, generellen Aussage, dass damit das Risiko eines Geschwisterkindes zur Ausbildung einer Schwerhörigkeit bei 25 % liegt, scheint dieser diagnostische Weg jedoch auch angesichts der beschriebenen Varianz in der Expressivität der Schwerhörigkeit problematisch. Solange der Phänotyp nicht einem definitiven heterozygoten Genotyp zugeschrieben werden kann, ist eine valide und sinnvolle genetische Beratung schwer möglich und somit ist auch der Nachweis eines inkompletten Genotypes diagnostisch nicht sinnvoll.

## 7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von Mutationen im Connexin26-Gen für die untersuchte deutsche Patientengruppe mit 8,4% deutlich niedriger liegt als in Studien, die Patienten aus dem mediterranen Raum untersuchten. [Estivill, 1998 #13]. Studien an nordeuropäischen Patienten [Lench, 1998 #157] konnten mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt werden. Studien zu Prävalenzen von Mutationen auf dem kodierenden Connexin26 Gen in Mitteleuropa konnten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zusammenstellung der Patientenkollektive ebenfalls bestätigt werden. Es liegt somit der Schluss nahe, dass Mutationen auf dem kodierenden Connexin26 Gen Mitteleuropa weniger häufig vorkommen als in mediterranen Gebieten. Demzufolge müssten in Mitteleuropa Mutationen auf einem anderen als dem kodierenden Exon2 des Connexin26 Genes für Mutationen verantwortlich sein. Dafür in Frage kommende Gene könnten weitere Gene aus der Connexin-Familie sein, die zusammen mit einer Mutation auf dem Connexin26 Gen einen compound Genotyp ergeben.

Für die Zukunft empfiehlt sich die genaue phänotypische Charakterisierung von Patienten, die Mutationen auf dem Connexin26 Gen aufweisen. Es hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass in der Gruppe der Patienten, die mindestens von einer hochgradigen Schwerhörigkeit betroffen waren, deutlich mehr Patienten eine Mutation auf dem kodierenden Connexin26 Gen aufweisen. Durch eine weitere phänotypische Charakterisierung dieser Patienten könnte möglicherweise eine Sub-Gruppe identifiziert werden, die nochmals erhöhte Mutations-Prävalenzen aufweist und in der infolgedessen eine genetische Diagnostik zur Erfassung des Erkrankungsrisikos und zur Frühdiagnose bei möglicherweise betroffenen Risiko-Neugeborenen sinnvoll sein könnte.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. Hum Mutat 1998; 11:1-3.
2. Berghaus A. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. In: Bob AB, K, ed. Duale Reihe. Stuttgart: Hippokrates, 1996.
3. Bonilla AJ. The Microtia Homepage, <http://www.microtia.net>, J. Arturo Bonilla, 1999.
4. Böhme G. in: Berghaus, Alexander: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. In: Bob AB, K, ed. Duale Reihe. Stuttgart: Hippokrates, 1996.
5. Böhme G. Audiometrie. In: G.Böhme Kw-M, ed. Bern (u.a.): Huber, 1999:288 S.
6. Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. N Engl J Med 1995; 332:1323-9.
7. Brown KA, Janjua AH, Karbani G, et al. Linkage studies of non-syndromic recessive deafness (NSRD) in a family originating from the Mirpur region of Pakistan maps DFNB1 centromeric to D13S175. Hum Mol Genet 1996; 5:169-73.
8. Camp v. the hereditary hearing loss homepage. Vol. 2001, 2000.
9. Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. Hum Mol Genet 1997; 6:2163-72.
10. Chaib H, Lina-Granade G, Guilford P, et al. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. Hum Mol Genet 1994; 3:2219-22.
11. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). Pediatrics 1999; 103:546-50.
12. Cohn ES, Kelley PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. Am J Med Genet 1999; 89:130-6.
13. Dawson GD. A summation technique for the detection of small evoked potentials. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 1954; 6:65-84.
14. Deetjen S. Physiologie. München: Urban-Schwarzenberger, 1999:704.
15. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. Hum Mol Genet 1997; 6:2173-7.

16. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 1999; 353:1298-303.
17. Estivill X, Fortina P, Surrey S, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351:394-8.
18. Estivill. The Connexin26 homepage. Vol. 2001, 2001.
19. Evans WH, Ahmad S, Diez J, George CH, Kendall JM, Martin PE. Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. *Novartis Found Symp* 1999; 219:44-54.
20. Forge A. Gap junctions in the stria vascularis and effects of ethacrynic acid. *Hear Res* 1984; 13:189-200.
21. Forge A, Becker D, Casalotti S, et al. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp* 1999; 219:134-50.
22. Gabriel H, Kupsch P, Sudendey J, Winterhager E, Jahnke K, Lautermann J. Mutations in the connexin26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat* 2001; 17:521-2.
23. Gabriela R. Functional defects of CX26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 1998; 103.
24. Gasparini P, Estivill X, Volpini V, et al. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:83-8.
25. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:19-23.
26. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Jama* 1999; 281:2211-6.
27. Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23:16-8.
28. Guilford P, Dode C, Crozet F, et al. A YAC contig and an EST map in the pericentromeric region of chromosome 13 surrounding the loci for neurosensory nonsyndromic deafness (DFNB1 and DFNA3) and limb-girdle muscular dystrophy type 2C (LGMD2C). *Genomics* 1995; 29:163-9.

29. Houseman MJ, Ellis LA, Pagnamenta A, et al. Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J Med Genet* 2001; 38:20-5.
30. Jahnke K. The fine structure of freeze-fractured intercellular junctions in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol Suppl* 1975:1-40.
31. Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, et al. Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations - phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. *Hum Genet* 2002; 111:145-53.
32. Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, Fischel-Ghodsian N, Smith RJ. Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110:269-75.
33. Kajiwar K BE, Dryia TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 1994; 264:1604-8.
34. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1589-97.
35. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62:792-9.
36. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-3.
37. Kemperman M. Hearing loss and connexin 26. *J R Soc Med* 2002; 95:171-177.
38. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 1995; 191:101-18.
39. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32:163-6.
40. Klinke R. in: *Physiologie des Menschen*. In: Schmidt T, ed. Berlin Heidelberg: Springer, 1995.
41. Konigsmark BW, Gorlin, Robert J. *Genetic and Metabolic Deafness*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1976:371.
42. Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res* 2000; 462:197-207.

43. Kumar NM. Molecular biology of the interactions between connexins. Novartis Found Symp 1999; 219:6-16.
44. Kupka S, Mirghomizadeh F, Haug T, et al. [Mutational analysis of the connexin26 gene in sporadic cases of moderate to profound deafness]. Hno 2000; 48:671-4.
45. Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. J Cell Biol 1992; 118:1213-21.
46. Lehnhardt E. Praxis der Audiometrie. Stuttgart: Geirg Thieme Verlag, 1996.
47. Lench NJ, Markham AF, Mueller RF, et al. A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin 26 (GJB2). J Med Genet 1998; 35:151-2.
48. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. Lancet 1998; 351:415.
49. Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. Hum Mutat 2001; 18:460.
50. Liu X. Nonsyndromic hearing loss: An analysis of Audiograms. Ann Otol Rhinol Laryngol 1994; 103:428-33.
51. Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, et al. Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non- syndromic hearing loss. Hum Mol Genet 2000; 9:63-7.
52. Liu XZ, Xia XJ, Adams J, et al. Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. Hum Mol Genet 2001; 10:2945-51.
53. Lo WK, Shaw AP, Takemoto LJ, Grossniklaus HE, Tigges M. Gap junction structures and distribution patterns of immunoreactive connexins 46 and 50 in lens regrowths of Rhesus monkeys. Exp Eye Res 1996; 62:171-80.
54. Loizou PC. Introduction to cochlear implants. IEEE Eng Med Biol Mag 1999; 18:32-42.
55. Mackay D, Ionides A, Berry V, Moore A, Bhattacharya S, Shiels A. A new locus for dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 13. Am J Hum Genet 1997; 60:1474-8.
56. Mackay D, Ionides A, Kibar Z, et al. Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. Am J Hum Genet 1999; 64:1357-64.

57. Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH. Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2369-76.
58. Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 1995; 57:629-35.
59. McGuirt WT, Smith RJ. Connexin 26 as a cause of hereditary hearing loss. *Am J Audiol* 1999; 8:93-100.
60. Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, Gros D, Yamasaki H, Mesnil M. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-->q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72:185-6.
61. Mueller RF, Nehammer A, Middleton A, et al. Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 50:3-13.
62. Nicholl DST. Gentechnische Methoden. Labor im Focus. Vol. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995.
63. O'Brien J, al-Ubaidi MR, Ripps H. Connexin 35: a gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol Biol Cell* 1996; 7:233-43.
64. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 1996; 14:385-91.
65. Pschyrembel W. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. In: Zink DC, ed. Vol. 256. Berlin: deGruyter, 1990.
66. Ptok M. Das schwerhörige Kind. *Dt Ärzteblatt* 1997; Heft 28-29:A1932-1937.
67. Reardon MR. Inherited deafness in childhood - the genetic revolution unmask the clinical challenge. *Arch Dis Child*. 2000; 82:319-21.
68. Richard G, Rouan F, Willoughby CE, et al. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1341-8.
69. Santos-Sacchi J. Isolated supporting cells from the organ of Corti: some whole cell electrical characteristics and estimates of gap junctional conductance. *Hear Res* 1991; 52:89-98.
70. Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJ. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998; 391:32.

71. Somjen G. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1979;159-77.
72. Sosinsky GE. Molecular organization of gap junction membrane channels. *J Bioenerg Biomembr* 1996; 28:297-309.
73. Spicer SS, Schulte BA. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 1996; 100:80-100.
74. Spicer SS, Schulte BA. Evidence for a medial K<sup>+</sup> recycling pathway from inner hair cells. *Hear Res* 1998; 118:1-12.
75. Stebbings LA, Todman MG, Phelan P, Bacon JP, Davies JA. Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Mol Biol Cell* 2000; 11:2459-70.
76. Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Hum Mutat* 1999; 14:263-6.
77. Veenstra RD. Do connexin channels have a residual conductance state? *Biophys J* 1996; 70:1082-4.
78. Wendler J. *Lehrbuch der Phoniatrie und Pädaudiologie*. Stuttgart: Gerog thieme Verlag, 1987:427.
79. White TW, Bruzzone R. Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *J Bioenerg Biomembr* 1996; 28:339-50.
80. White TW, Deans MR, Kelsell DP, Paul DL. Connexin mutations in deafness. *Nature* 1998; 394:630-1.
81. Wilcox SA, Osborn AH, Allen-Powell DR, Maw MA, Dahl HH, Gardner RJ. Connexin26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet* 1999; 36:383-5.
82. Willecke K, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, Grzeschik KH. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur J Cell Biol* 1990; 53:275-80.
83. Willecke K, Kirchhoff S, Plum A, Temme A, Thonnissen E, Ott T. Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse. *Novartis Found Symp* 1999; 219:76-88.
84. Wiskot K. *Lehrbuch der Kinderheilkunde*. In: Betke K, ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1991.

85. Wolf SM. Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2001.
86. Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. Nat Genet 1998; 20:370-3.
87. Yoshinaga-Itano C, Sedey AL, Coulter DK, Mehl AL. Language of early- and later-identified children with hearing loss. Pediatrics 1998; 102:1161-71.
88. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non- syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 1997; 6:1605-9.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellen

Tabelle 5a

Dominante Mutationen				
Name der Mutation	Beschreibung	Auswirkung bei basepair	Betroffene Protein-Domäne	Literatur
I20T	T zu C bei 59	Ile zu Thr bei 20	IC1	Lvonfler et al, 2001
DelE42	del von GAG bei 125	Del von Glu bei 142	TM1	<a href="#">Bale et al 1999 other</a>
W44S	G zu C bei 131	Trp bei 44 zu Ser	EC1	Gasparini, PC
W44C	G zu C bei 132	Trp bei 44 zu Cys	EC1	<a href="#">Denoyelle et al 1998 other</a>
E129K	G zu A bei 385	Glu bei 129 zu Lys	IC2	Rehm, PC
R143Q	G zu A bei 428	Arg zu Gln bei 143	TM3	Lvonfler et al, 2001

Derzeit bekannte Mutationen auf dem Connexin26 Gen (stand April 2002)  
(Dominante Mutationen)



**Tabelle 5b:** Derzeit bekannte Mutationen auf dem Connexin26 Gen (stand April 2002)  
(Rezessive Mutationen)

Name der Mutation	Beschreibung	Auswirkung bei basepair	Betroffene Protein-Domäne	Literatur
-3170G zu A	G zu A bei -3170	Splice site	none	<a href="#">Denoyelle et al 1999 other</a>
IVS+1 G zu A	G zu A bei -3170	Splice site	none	<a href="#">Green et al 1999 other</a>
R32C	C zu T bei 94	Arg bei 32 zu Cis	IC1	<a href="#">Prasad et al 2000 other</a>
M1V	A zu G bei 1	Protein start bei Met 34	IC1	<a href="#">Estivill et al 1998 other</a>
T8M	C zu T bei 23	Tre bei 8 zu Met	IC1	Rehm, PC
31del14	del von 14 nt bei 31	Frameshift	IC1	<a href="#">Murgia et al 1999 other</a>
31del38	del von 38 nt bei 31	Frameshift	IC1	<a href="#">Denoyelle et al 1997 other</a>
G12V	G zu T bei 35	Gly bei 12 zu Val	IC1	<a href="#">Rabionet et al 2000a other</a>
35delG	del von G bei 30-35	Frameshift	IC1	<a href="#">Zelante et al 1997 other</a>
30delG	del von G bei 30-35	Frameshift	IC1	<a href="#">Denoyelle et al 1997 other</a>
35insG	ins von G bei 30-35	Frameshift	IC1	<a href="#">Estivill et al 1998 other</a>
51del12insA	del von 12 nt and ins von A bei 51	Frameshift	IC1	<a href="#">Sobe et al 2000 other</a>
S19T	G zu C bei 56	Ser bei 19 zu Thr	IC1	<a href="#">Rabionet et al 2000a other</a>

**Tabelle 5b** derzeit bekannte Mutationen auf dem Connexin26 Gen (stand April 2002)  
(Rezessive Mutationen) (**Fortsetzung 1**)

Name der Mutation	Beschreibung	Auswirkung bei basepair	Betroffene Protein-Domäne	Literatur
M34T	T zu C bei 101	Met bei 34 zu Thr	TM1	<a href="#">Kelsell et al 1997</a> <a href="#">other</a>
V37I	G zu A bei 109	Val bei 37 zu Ile	TM1	<a href="#">Kelley et al 1998</a> <a href="#">other</a>
V37I	G zu A bei 109	Val bei 37 zu Ile	TM1	<a href="#">Rabionet et al 2000a</a> <a href="#">other</a>
A40E	C zu A bei 119	Ala bei 40 zu Glu	EC1	L Perroni, PC
W44X	G zu A bei 132	Trp bei 44 zu Szup	EC1	<a href="#">Green et al 1999</a> <a href="#">other</a>
G45E	G zu A bei 134	Gly bei 45 zu Glu	EC1	<a href="#">Abe et al 2000</a> <a href="#">other</a>
E47X	G zu T bei 139	Glu bei 47 zu Szup	EC1	<a href="#">Denoyelle et al 1997</a> <a href="#">other</a>
E47K	G zu A bei 139	Glu bei 47 zu Lys	EC1	<a href="#">Prasad et al 2000</a> <a href="#">other</a>
167delT	del von T bei 167	Frameshift	EC1	<a href="#">Zelante et al 1997</a> <a href="#">other</a>
Q57X	C zu T bei 169	Gln bei 57 zu Szup	EC1	<a href="#">Wilcox et al 1999</a> <a href="#">other</a>
176-191del16	del von 16 nt bei 176	Frameshift	EC1	<a href="#">Kudo et al 2000</a> <a href="#">other</a>
Y65X	C zu G bei 195	Tyr bei 65 zu Szup	EC1	<a href="#">Estivill et al 1998</a> <a href="#">other</a>
W77R	T zu C bei 229	Trp bei 77 zu Arg	TM2	<a href="#">Carrasquillo et al 1997</a> <a href="#">other</a>
W77X	G zu A bei 231	Trp bei 77 zu Szup	TM2	<a href="#">Kelsell et al 1997</a> <a href="#">other</a>
235delC	Del von C bei 233-235	Frameshift	TM2	<a href="#">Fuse et al 1999</a> <a href="#">other</a>
Q80P	A zu C bei 239	Gln bei 80 zu Pro	TM2	Hilbert, PC
I82M	C zu G bei 246	Ile bei 82 zu Met	TM2	Pandya, PC
V84L	G zu C bei 250	Val bei 84 zu Leu	TM2	<a href="#">Kelley et al 1998</a> <a href="#">other</a>
S85P	T zu C bei 253	Ser bei 85 zu Pro	TM2	<a href="#">Park et al 2000</a> <a href="#">other</a>
L90P	T zu C bei 269	Leu bei 90 zu Pro	TM2	<a href="#">Murgia et al 1999</a> <a href="#">other</a>
269insT	ins von T bei 269	Frameshift	TM2	<a href="#">Denoyelle et al 1999</a> <a href="#">other</a>
V95M	G zu A bei 283	Val bei 95 zu Met	IC2	<a href="#">Kelley et al 1998</a> <a href="#">other</a>
Y97X	not described	Tyr bei 97 zu Szup	IC2	L Perroni, PC
H100Y	C zu T bei 298	His bei 100 zu Tyr	IC2	<a href="#">Green et al 1999</a> <a href="#">other</a>
299-300delBEI	del von BEI bei 299	Frameshift	IC2	<a href="#">Abe et al 2000</a> <a href="#">other</a>
302del3	del von AGA bei 302	del von Lys bei 102	IC2	<a href="#">Mueller et al 1999</a> <a href="#">other</a>
310del14	del von 14 nt bei 314	Frameshift	IC2	<a href="#">Denoyelle et al 1997</a> <a href="#">other</a>
312del14	del von 14 nt bei 312	Frameshift	IC2	<a href="#">Denoyelle et al 1999</a> <a href="#">other</a>
314del14	del von 14 nt bei 310	Frameshift	IC2	<a href="#">Kelley et al 1998</a> <a href="#">other</a>

**Tabelle 5b** derzeit bekannte Mutationen auf dem Connexin26 Gen (stand April 2002)  
(Rezessive Mutationen) (**Fortsetzung 2**)

Name der Mutation	Beschreibung	Auswirkung bei basepair	Betroffene Protein-Domäne	Literatur
333-334delAA	del von AA bei 333-335	Frameshift	IC2	<a href="#">Kelley et al 1998 other</a>
S113R	T zu G bei 339	Ser bei 113 zu Arg	IC2	<a href="#">Kelley et al 1998 other</a>
DelE120	del von GAG bei	del von Glu bei 119-120	IC2	<a href="#">Denoyelle et al 1999 other</a>
K122I	A zu T bei 365	Lys bei 122 zu Ile	IC2	<a href="#">Green et al 1999 other</a>
Q124X	C zu T bei 370	Gln bei 124 zu Szup	IC2	<a href="#">Scott et al 1998b other</a>
Y136X	C zu A bei 408	Tyr bei 136 zu Szup	IC2	<a href="#">Fuse et al 1999 other</a>
R143W	C zu T bei 427	Arg bei 143 zu Trp	IC2	<a href="#">Brobbly et al 1998 other</a>
E147K	G zu A bei 439	Glu bei 147 zu Lys	TM3	Murgia, PC
469delG	del ot G bei 469	frameshift	EC2	<a href="#">Mueller et al 1999 other</a>
486insT	ins von T bei 486	Frameshift	EC2	Anzuniadi, Brondum-nielsen, petersen
509del14	del von 14 nt bei 509	Frameshift	EC2	Anzuniadi, Brondum-Nielsen, Petersen
509insA	ins von A bei 509	Frameshift	EC2	<a href="#">Denoyelle et al 1999 other</a>
515del17	del von 17 nt bei 515	Frameshift	EC2	L Perroni, PC
P175T	C zu T bei 523	Pro bei 175 zu Thr	EC2	<a href="#">Denoyelle et al 1999 other</a>
R184W	C zu G bei 550	Arg bei 184 zu Trp	EC2	<a href="#">Wilcox et al 2000 other</a>
R184P	G zu C bei 551	Arg bei 184 zu Pro	EC2	<a href="#">Denoyelle et al 1997 other</a>
S199F	C zu T bei 596	Ser bei 199 zu Phe	EC	<a href="#">Green et al 1999 other</a>
N206S	A zu G bei 617	Gln bei 206 zu Ser	IC3	Rehm, PC
631delGT	del von GT bei 631-632	Frameshift	IC3	<a href="#">Kelley et al 1998 other</a>
645-648delTAGA	del von TAGA bei 645	frameshift	IC3	<a href="#">Prasad et al 2000 other</a>

## **9.2 Einverständniserklärung/Erhebungsbogen/ Patienteninformation**

### **Connexin 26-Studie**

Diese Studie wird bei Kindern durchgeführt, die ohne erkennbare Ursache seit der Geburt schwerhörig sind oder danach ohne erkennbare Ursache eine Hörstörung entwickelt haben. Bei sporadische ohne Hinweis auf erbliche oder andere Ursachen auftretenden Hörstörungen konnte im Mittelmeerraum ein Defekt des Connexin 26-Gens bei über einem Drittel der Patienten nachgewiesen werden.

Ziel unserer Studie ist es die Untersuchung der Häufigkeit von Veränderungen im Connexin-Gen in Deutschland.

Die Untersuchung wird gemeinsam mit anderen pädaudiologischen Abteilungen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Erforderlich ist zusätzlich zur pädaudiologischen Untersuchung lediglich eine Abnahme von 5ml Blut. Im Blut wird das Connexin 26 –Gen auf Veränderungen (Mutationen) untersucht. Die Blutproben werden ausschließlich innerhalb dieser Studie untersucht, eine weitere Verwendung ist ausgeschlossen. Innerhalb der Studie werden die Proben anonymisiert, um Datenschutz zu gewährleisten.

Falls Sie weitere Fragen zu der Studie haben, hier folgende Adressen:

#### **Ansprechpartner für Fragen zum Krankheitsbild:**

**Frau Prof. Dr. A. Lamprecht-Dinnesen (Tel.:0251-8356959)**

**Herr OA Dr. E. Seifert (Tel.: 0251-8356871)**

Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie

Kardinal-von-Galen-Ring 10

48129 Münster

#### **Ansprechpartner für die Laboruntersuchung und Adressat der Blutproben**

**Herr Prof. Dr. T. Deufel, Herr Wolf, Herr Dr. Boensch**

Institut für Klinische Chemie

und Laboratoriumsdiagnostik

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Postfach 07740 Jena

Tel.: 03641-934030

## **Einverständniserklärung**

Hiermit erkläre ich mich einverstanden, dass bei meinem Kind

\_\_\_\_\_ geb. am \_\_\_\_\_

wohnhaft: \_\_\_\_\_

5 ml Blut abgenommen werden, und eine Untersuchung des Connexin 26-Gens durchgeführt wird.

Wir nehmen zur Kenntnis, dass uns Datenschutz und die Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht zugesichert werden, und die Teilnahme an der Studie von uns jederzeit und ohne Angaben von Gründen und ohne Nachteile zurückgenommen werden kann.

Ort, Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift der gesetzlichen Vertreter

Unterschrift des aufklärenden Arztes

## Fragebogen

Anamnese

Familienanamnese,  
Hör-, Sprachstörungen, neurologische Erkrankungen

Ethnische Herkunft des Patienten

Schwangerschaft

Geburt

Postnatale Phase

Kinderkrankheiten

Impfkomplikationen

Hochfiebrige Virusinfekte

Meningitis

Krampfleiden

Häufige Erkältungen

Mittelohrerkrankungen

Allergien

Operationen

Kopfverletzungen

Medikamenten-Einnahme  
Über längeren Zeitraum

Statomotorische Entwicklung

Sprachliche Entwicklung

Beginn der Hörstörung

Progredienz

HNO-Status

Pigmentierungstyp/ Augenfarbe

Ohr rechts:

Ohr links:

Nase:

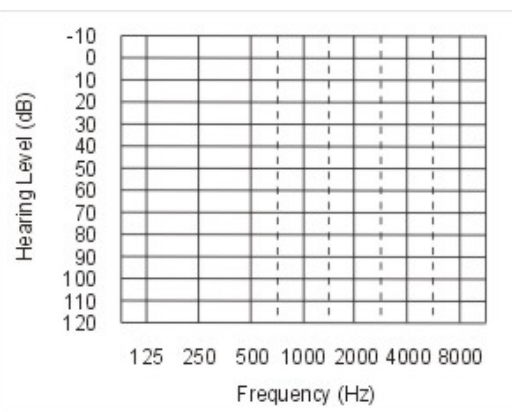
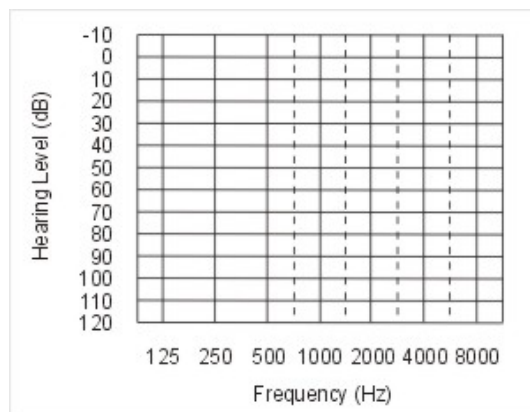
Mundrachen/Hartgaumen:

Nasenrachen:

Fehlbildungen:

Pädaudiometrie

Tonaudiogramm/ Freifeldaudiogramm



evtl.

Tympanogramm

	Rechts	Links
o.B.		
Belüft.- Störung		
Pauken- erguß		

evtl.

Stapediusreflexe (contra)

	Rechts	Links
500 Hz		
1000 Hz		
2000 Hz		
4000 Hz		

**Evtl. Hirnstammaudiometrie**

	1 kHz	1.5 kHz	2 kHz	3 kHz	4 kHz	6 kHz	8 kHz
Rechts							dBnHL
Links							dBnHL

**Evtl. Otoakustische Emissionen:**

	Rechts	Links
Reproduzierbarkeit bei ausreichender Stimulusstabilität	%	%
Keine ausreichende Stimulusstabilität		

Pädaudiologische Diagnose (ohrseite, Ausmaß, Frequenz, Beginn, Verlauf):

Blutentnahme am:

Ergebnis Blutentnahme:

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift Pädaudiologe)



## 9.3 Sequenzmuster

### 9.3.1 Primer

#### 9.3.1.1 Typisches Sequenzmuster von Primer revold

**Abbildung 17:** typisches Sequenzmuster von Primer revold



### 9.3.1.2 Sequenzmuster von Primer revnew

**Abbildung 18:** typisches Sequenzmuster von Primer revnew

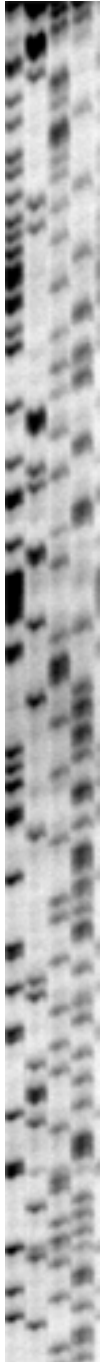
Fortsetzung Sequenzmuster Primer revnew



### 9.3.1.3 Sequenzmuster von Primer fornew

**Abbildung 19:** typisches Sequenzmuster von Primer fornew

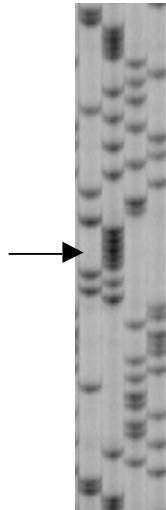
Fortsetzung Sequenzmuster Primer fornew



### 9.3.2 Sequenzmuster von Mutationen

#### 9.3.2.1 Homozygote Gdel35 Mutation

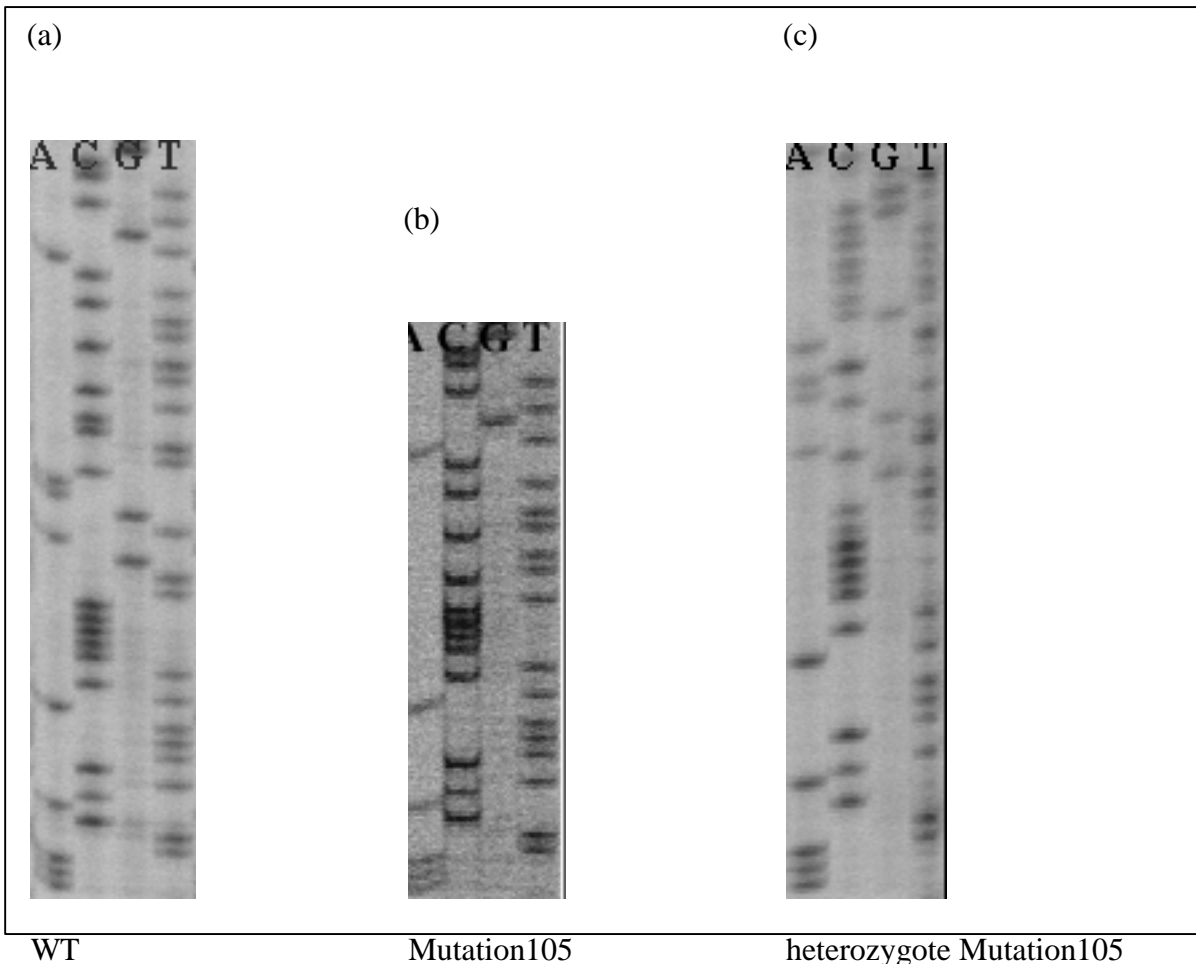
##### Sequenzmuster einer homozygoten Gdel35 Mutation



**Abbildung 34:** an der markierten Stelle treten anstatt wie in der Wildtyp sechs Guanin nur fünf Guanin in Folge auf. (Zweite Spur)

### 9.3.2.2 Sequenzmuster Mutation 105

**Abbildung 36: Sequenzmuster-Darstellung der Mutation 105**

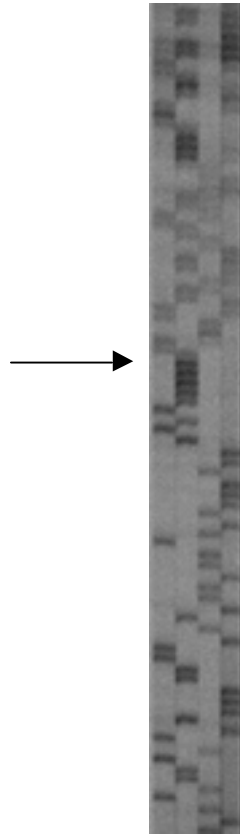


**Abbildung 36:** Darstellung der Sequenzmuster des Bereiches um Mutation 105 als WT (a), als klonierte Mutation 105 (b) und als heterozygotes Sequenzmuster (c)

Abbildung 36 zeigt die Sequenz des Wildtyps (WT) und der Mutation105. Beide Sequenzen wurden nach der Klonierung des Connexin26 Gen des betroffenen Patienten erhalten, bei dem sich in der Sequenzierung der DNA Bild (c) zeigte. Dort ist die Sequenz nach der Mutation an Stelle bp (base pair) 322 in Leserichtung nicht mehr lesbar, da sich die Sequenz des an dieser Stelle mutierten mit der Sequenz des an dieser Stelle nicht-mutierten Genes überlagern.

### 9.3.2.3 Heterozygote Gdel35 Mutation

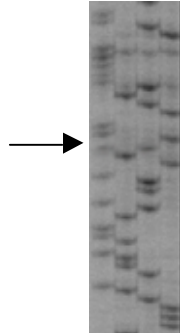
#### Sequenzmuster einer heterozygoten Gdel35



**Abbildung 37:** Ab der gekennzeichneten Stelle treten in Leserichtung aufwärts (komplementär Strang!) nur noch Doppelbanden auf. Dies deutet darauf hin, dass unmittelbar vor dem Auftreten der Doppelbanden eine Base an nur einem Strang fehlt, die Banden des Partnerstranges projizieren sich jetzt –nach dem Prinzip der Abbruch Methode– versetzt und es entstehen Doppelbanden.

#### 9.3.2.4 Heterozygote M34T (101T-C)

##### Sequenzmuster einer heterozygoten M34T Mutation



**Abbildung 39:** An der markierten Stelle fallen sowohl eine Bande in der „A“ Spur (1.Spur) als auch in der „G“ Spur (3.Spur) auf. (komplementär Strang sequenziert) Im Wildtyp stellt sich keine Bande in der „G“ Spur auf. Das Ergebnis wurde in mehreren Sequenzierungen überprüft.

## **9.4 Danksagung**

Die vorliegende Doktorarbeit habe ich in der Zeit von April 1999 bis Januar 2002 am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med Thomas Deufel angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Univ. Prof. Dr. Tomas Deufel dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Labor für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik anzufertigen; gleichzeitig danke ich ihm für die tatkräftige Unterstützung, die zahlreichen aufgebrauchten Stunden für diese Arbeit und die Hartnäckigkeit, mit der er ein Vorbild für mich und viele Studierende war und ist;

Frau Univ. Prof. Dr. Lamprecht-Dinnesen und Dr. Hahn für die Aufnahme der Probanden in diese Studie und für die Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie an der Universität Münster;

Herrn Dr. Peter Storch, Dr. Dominikus Boensch und Dr. Jörg Schickel für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die vielen amüsanten Stunden in und außerhalb des Instituts;

Frau Cora Neumann für die anregenden Tipps zu jeder Uhrzeit;

### **den Patienten und Angehörigen für Ihre Kooperation und Verständnis;**

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes möchte ich für die herzliche Aufnahme und die sehr angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfe und Unterstützung danken. Auch allen nicht erwähnten Mitarbeitern danke ich für das hervorragende Arbeitsklima. Ich habe die Zeit im Institut genossen und werde ewig mit Freude daran zurückdenken.

Ich danke weiterhin Herrn Dr. Norbert Heinicke, Frau Ulrike Hüber und Frau Almut Wedel sowie meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit.



## 9.5 Lebenslauf

Armin Wolf

Geboren 02.09.1973, München

1980 – 1994	Schul Ausbildung, (Werdenfelsschule, Ludwigsgymnasium, München, Wichita South Highschool, Wichita)
1994 - 2001	Studium Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
2000-2002	Consultant „Patient Media“, Firma Medkonsult, GbR
2001-2002	Senior Partner/ Consultant / Project Manager Firma ClinComm, GbR
2002-2003	Arzt im Praktikum, Augenklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität, München
2003	Approbation
seit 2003	Assistenarzt, Augenklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität, München

## 9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Thomas Deufel,  
Dr. Peter Storch  
Dr. Dominikus Boensch  
Dr. Jörg Schickel  
Dr. Martin Roskos  
Dr. Wolfgang Wolf

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 24.09.2003

Armin Wolf